



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Hévila Brognaro dos Santos

Estudo do potencial enzimático hidrolítico e oxidativo do
microorganismo *Myceliophthora thermophila* M.7.7.

São José do Rio Preto
2014

Hévila Brognaro dos Santos

Estudo do potencial enzimático hidrolítico e oxidativo do
microorganismo *Myceliophthora thermophila* M.7.7.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Física, Área de Concentração - Cristalografia de Proteínas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir
Krishnaswamy Arni

São José do Rio Preto
2014

Santos, Hévila Brognaro dos.

Estudo do potencial enzimático hidrolítico e oxidativo do microorganismo *Myceliophthora thermophila* M.7.7. / Hévila Brognaro dos Santos. -- São José do Rio Preto, 2014
148 f. : il.

Orientador: Raghuvir Krishnaswamy Arni

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Enzimas. 4. Biomassa. 5. Espectrometria de massa. 6. Cinética de enzimas. 7. Hidrólise enzimática. I. Arni, Raghuvir Krishnaswamy. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.15.03

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Hévila Brognaro dos Santos

Estudo do potencial enzimático hidrolítico e oxidativo do
microorganismo *Myceliophthora thermophila* M.7.7.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Física, Área de Concentração - Cristalografia de proteínas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella
CTBE – Campinas

Prof. Dr. Roberto Ruller
CTBE – Campinas

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
07 de fevereiro de 2014

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

- a minha irmã Fernanda Brognaro dos Santos e minha amiga Eliana Mendes Furtado pelo auxílio na edição dessa tese e mais importante pelo acolhimento nos momentos difíceis,
- ao Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni pelas oportunidades e a confiança a mim depositada,
- aos meus amigos de laboratório Carol Wilson, Vinícius Santana, Ricardo Mariutti, Monika Coronado, Anwar Ullah e Rehana Masood obrigada pelo auxílio e disposição,
- a todo o corpo técnico-científico do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnológica do Bioetanol, em especial a Priscila Dellabona e a Deise Lima, sendo especialmente também lembrado Júnio Cota por toda sua dedicação, conhecimento e disposição em todos os momentos que necessitei de auxílio,
- a Capes pelo auxílio financeiro,
- ao Program do CNPq, Ciência sem Fronteiras (processo 201319/2012-8) que possibilitou o doutorado sanduíche no Departamento de Microbiologia e Genética Molecular na Oklahoma State University, EUA,
- aos membros do Departamento de Física pela ajuda e amizade.

Resumo

Neste trabalho foram estudados os sistemas enzimáticos hidrolítico e oxidativo do ascomiceto termotolerante *Myceliophthora thermophila* M.7.7. Seis diferentes secretomas foram avaliados por espectroscopia de massas que identificou o total de 187 proteínas confirmando a presença do clássico sistema enzimático hidrolítico revelando também a produção de enzimas do sistema oxidativo de degradação. As enzimas mais abundantes foram celobiose desidrogenase e glicosídeo hidrolase família 7 secretadas principalmente nos bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e explodido a vapor. A abundante produção de glicosídeo hidrolases foi identificada quando polissacarídeos de hemiceluloses foram a fonte de carbono empregada, mostrando que a produção de enzimas é substrato específica. O isolamento, a caracterização bioquímica e o estudo cinético enzimático de uma β -glicosidase do *M. thermophila* M.7.7. também foram realizados. A β -glicosidase purificada apresentou excelentes parâmetros para sua aplicabilidade como enzima suplementar a coquetéis enzimáticos ou até mesmo sua clonagem e expressão em organismos deficientes em β -glicosidase. Experimentos de hidrólise enzimática também foram executados empregando o extrato bruto de *M. thermophila*, que resultou em uma conversão de 21% em bagaço *in natura* e 16% em celulose comercial mesmo com baixa carga de proteínas, indicando maior especificidade e sinergia do complexo enzimático à polímeros de celulose com maior índice de cristalinidade e grau de polimerização em sua estrutura.

Palavras-chave: *Myceliophthora thermophila*, biomassa, fermentação submersa, enzimas hidrolíticas e oxidativas, espectrometria de massas, cinética e hidrólise enzimática.

Abstract

*In terms of the here presented PhD research project the hydrolytic and oxidative enzymatic properties from the ascomycota and thermotolerant fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7. were investigated in detail. Six different secretomes were analysed by mass spectroscopy and 187 proteins were identified. Within these proteins beside already known and expected enzymes also several oxidative active enzymes were confirmed. Enzymes belonging to the cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase family 7 were most abundant, when in natura and steam exploded sugar cane bagasses were used as carbon source. Particular a high abundance of glycoside hydrolases was identified when a mixture of hemicelluloses was applied as sole carbon source. In this case the secretome analysis showed a substrate-specific secretion for this fungus. The isolation, purification and characterization of a β -glycosidase from *M. thermophila* M.7.7. showed and confirmed excellent enzymatic characteristics and parameters for future potential applications as a supplemental enzyme in enzyme cocktails, or implanting by molecular biology in organisms deficient in β -glucosidase. Even at low protein concentration the enzymatic hydrolysis, utilizing the crude extract, resulted in a conversion of approx. 21% in natura bagasse and approx. 16% in commercial cellulose, indicating a high specificity and synergy of the enzyme complex to cellulose polymers with a higher degree of polymerization and crystallinity index in its structure.*

*Key words: *Myceliophthora thermophila*, biomass, submerged fermentation, hydrolytic and oxidative enzymes, mass spectrometry, enzymatic hydrolysis and kinetics.*

Lista de Tabelas

Tabela 1. Divisão das subfamílias e atividades da classe AA.....	28
Tabela 2. Ensaios realizados em tanques agitados com 2 L de capacidade.....	46
Tabela 3. Recuperação da β -glicosidase durante as etapas de separação.....	54
Tabela 4. Parâmetros cinéticos da β -glicosidase de <i>M. thermophila</i> M.7.7.....	61

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema da parede celular vegetal.....	17
Figura 2. A estrutura da celulose.....	17
Figura 3. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. D-glicose (1), D-galactose (2), L-arabinose (3), D-xilose (4), D-manose (5), 4-O-metil-D-glucurônico (6), L-ramnose (7).....	19
Figura 4. Representação esquemática de uma xilana de gramínea. 1,4 D-xilopirranose (1), L-arabinose (2), ácido 4-O-D-metil- α -glucurônico (3), grupo acetil (4).....	19
Figura 5. Modelo de uma estrutura de lignina.....	20
Figura 6. Atividade enzimática de FPases (A), xilanases (B) e β -glicosidases (C) em diferentes fontes de carbono em até 120 horas de cultivo.....	44
Figura 7. Distribuição e classificação das proteínas encontradas nos secretomas de <i>M. thermophila</i> correspondente a nomenclatura do CAZy quando CEL, XIL, BIN, BED e BEX foram usados como meio de cultivo.....	50
Figura 8. Perfil de eluição de β -glicosidase na cromatografia em resina de troca iônica (A), em resina hidrofóbica (B) e em exclusão molecular (C).....	55
Fig 9. Passos de purificação da β -glucosidase por PAGE não desnaturante corada com nitrato de prata. 1-marcador molecular, 2-extrato cru, 3-troca iônica, 4-interação hidrofóbica, 5-exclusão molecular and 6-zimograma para β -glicosidase. Os detalhes estão descritos na seção de material e métodos.....	56
Figura 10. Temperatura ótima (A) e pH (B) do extrato bruto e da MTbgl3b de <i>Myceliophthora thermophila</i> M.7.7.....	57
Figura 11. Atividade residual da MTbgl3b e regressão linear do plot de Ln das atividades residuais (AR) em função do tempo de incubação em 50°C (A), 60°C (B) e 70°C (C)...	58
Figura 12. Tempos de meia vida em função da temperatura de incubação para a MTbgl3b nos valores de pH de 5,0 e 7,4.....	59
Figura 13. Cálculo da energia de ativação da desnaturação empregando a técnica da linearização da equação de Arrhenius.....	60
Figura 14. Lineweaver-burk plot da MTbgl3b em p- β -NPG inibida por D-glicose variando de 0 até 40 mM (A). Taxas iniciais da hidrólise de p- β -NPG and cellobiose aplicando o extrato bruto e a MTbgl3b de <i>Myceliophthora thermophila</i> M.7.7. (B).....	62

Figura 15 Efeito de íons sobre a atividade enzimática da MTbgl3b.....	63
Figura 16 Efeito de solventes sobre a atividade enzimática da MTbgl3b.....	63
Figura 17. Efeito de diferente % (v/v) de metanol e etanol na atividade enzimática de MTbgl3b.....	64
Figura 18. Efeito de aril-glicosídeos e sacarídeos na atividade específica de MTbgl3b.....	65
Figura 19. Concentração (g/L) de glicose mais ácido glucônico (A) e celobiose mais ácido celobiônico (B) medido após hidrólise enzimática a 5% (p/v) de celufloc (EC), bagaço <i>in natura</i> (BIN) e bagaços pré-tratados (BED e BEX) a 50°C, usando como coquetel enzimático o extrato bruto do <i>M. thermophila</i> produzido em BIN como fonte de carbono.....	67
Figura 20. Concentrações (g/L) de xilose e arabinose medidas após hidrólise enzimática a 5% (p/v) de celufloc (EC), bagaço <i>in natura</i> (BIN) e bagaços pré-tratados (BED e BEX) a 50°C, usando como coquetel enzimático o extrato bruto do <i>M. thermophila</i> produzido em BIN como fonte de carbono.....	69
Figura 21. Conversão da celulose nas hidrólises de celufloc (EC), bagaço <i>in natura</i> (BIN) e bagaços pré-tratados (BED e BEX).....	69

Lista de Tabelas Suplementares

Tabela S1.....	116
Tabela S2.....	118
Tabela S3.....	119
Tabela S4.....	120
Tabela S5.....	121
Tabela S6.....	123

Abreviações

CEL	mistura de avicel e carboximetilcelulose 1:1 (p/p)
BIN	bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>
BEX	bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor
BED	bagaço de cana-de-açúcar explodido e deslignificado
XIL	mistura de xilanas lineares e ramificadas (beech and birchwood xilana, oat spelt, arabinana e arabinoxilana 1:1:1:1:1)
FT	farelo de trigo
EC	celufloc
CDH	celobiose desidrogenase
GH	glicosídeo hidrolase
CE	carboidrato esterase
PL	polissacarídeo liase
AA	atividades auxiliares
CBM	módulo de ligação de celulose
EB	extrato bruto
AV	avicel
CMC	carboximetilcelulose
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
HIC	cromatografia de hidrofobicidade
LC-MS/MS	cromatografia líquida e espectrometria de massas
Glc+GlcA	co-eluição de glicose e ácido glucônico
GlcGlc+GlcGlcA	co-eluição de celobiose e ácido celobiônico

Sumário

1. Introdução	14
2. Revisão Bibliográfica	16
2.1 A biomassa lignocelulósica	16
2.2 Enzimas envolvidas na degradação dos polissacarídeos presentes na parede celular dos vegetais	21
2.2.1 Celulases	21
2.2.2 Hemicelulases	23
2.2.3 Atividades Auxiliares	25
2.2.4 Sinergismo	29
2.3 Produção de enzimas por Fermentação Submersa	30
2.4 Pré-tratamento da biomassa	31
2.5 Cinética enzimática	32
2.5.1 Aspectos gerais	32
2.5.2 Cinética de desnaturação/desativação e tempo de meia-vida	33
3. Objetivos	35
4. Materiais e métodos	36
4.1 Produção das enzimas	36
4.1.1 Substratos	36
4.1.2 Meio de cultivo para placa de petri	36
4.1.3 Solução Nutriente	36
4.1.4 Preparo do pré-inóculo	37
4.1.5 Fermentação líquida em frascos agitados	37
4.1.6 Fermentação em biorreatores com tanque agitado	37
4.2 Determinação das atividades enzimáticas	38
4.2.1 FPase	38
4.2.2 Xilanase	38
4.2.3 β -glicosidase	38
4.2.4 Preparo do reagente de DNS	39
4.3 Dosagem de proteínas totais	39
4.4 Purificação das enzimas produzidas por <i>Myceliophthora thermophila</i> M.7.7.	39
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
4.6 Zimograma	40
4.7 Ensaios padrões para a caracterização bioquímica e cinética da β -glicosidase	40
4.8 Hidrólise enzimática	41
4.9 Fingerprinting do secretoma de <i>Myceliophthora thermophila</i> M.7.7. empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas	42
5. Resultados e Discussão	42
5.1 Fermentação submersa	42
5.1.1 Influência das fontes de carbono no sistema de produção de enzimas hemicelulolíticas em shaker	42
5.1.2 Fermentação submersa em tanques agitados	46
5.2 Análise do secretoma do <i>Myceliophthora thermophila</i> M.7.7. crescido em diferentes fontes de carbono por espectrometria de massas	48
5.3 Purificação da β -glicosidase produzida pelo <i>M. thermophila</i> M.7.7.	53
5.4 Caracterização bioquímica e determinação dos parâmetros cinéticos da β -glicosidase de <i>Myceliophthora thermophila</i> M.7.7.	56
5.4.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da β -glucosidase pura e das β -glucosidases presentes no extrato bruto.	56
5.4.2 Desnaturação térmica da MTbgl3b	57
5.4.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos da MTbgl3b	60
5.4.4 Susceptibilidade da MTbgl3b a sais e agentes caotrópicos	62
5.4.5 Especificidade da MTbgl3b a diferentes substratos	65
5.5 Hidrólise enzimática empregando o coquetel enzimático bruto do <i>Myceliophthora thermophila</i> M.7.7. produzido em bagaço de cana-de-açúcar in natura	65

6. Conclusões	70
7. Perspectivas	71
Referências	72
<i>Lista de manuscritos em fase final de edição</i>	84

1. Introdução

A biodegradação de materiais lignocelulósicos constituídos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, é um processo natural de reciclagem de matéria orgânica que atualmente permanece como alvo de muitos estudos devido à grande quantidade de biomassa gerada a partir de resíduos industriais que representam uma fonte barata para o crescimento de microrganismos capazes de produzir metabólitos com alto valor agregado, como enzimas, solventes orgânicos e açúcares. Logo a biodegradação entra no contexto atual com o objetivo de desenvolver métodos menos ofensivos ao meio ambiente, além de ser apontada como grande aposta para a solução do problema energético mundial.

Nas últimas décadas, a busca por novas tecnologias e o interesse em estudos dos sistemas xilanolítico e celulolítico de fungos termófilos aumentou consideravelmente o desenvolvimento de pesquisas visando a ampla utilização das suas enzimas em diversos setores industriais e aplicações biotecnológicas. As xilanases, quando livres de celulasas, podem ser utilizadas nas indústrias de papel e celulose, auxiliando no branqueamento da polpa, facilitando a remoção da lignina, podendo ser aplicadas para modificar a polpa ou então serem utilizadas no processo de reciclagem do papel. Possuem também aplicações farmacêutica, têxtil, nas indústrias de bebidas e de alimentos, onde se destacam na produção de xilooligossacarídeos para enriquecimento de alimentos funcionais. As xilanases em associação com outras enzimas, tais como celulasas, podem ser empregadas na remoção da parede celular vegetal, aprimorando o processo de extração de óleos vegetais. Podem também ser utilizadas na produção de sucos de frutas, na clarificação de sucos e vinhos, na fabricação de café solúvel, na obtenção de protoplastos para uso em engenharia genética, no aumento do teor nutricional da silagem, no melhoramento da re-hidratação de vegetais secos e para dar textura aos derivados lácteos (Kuhad, Singh e Eriksson, 1997).

As celulasas têm atraído bastante interesse comercial devido as suas várias aplicações em áreas como bioconversão de materiais celulósicos, alimentação, têxteis, farmacêuticos, detergentes, tratamento de efluentes e processamento de frutas e vegetais. O interesse na aplicação de enzimas na indústria de papel tem aumentado e uma das principais aplicações tem sido na remoção de tintas de papéis reciclados. As celulasas também têm sido utilizadas com sucesso na indústria têxtil para o “bio-stoning” de jeans

e o “bio-polishing” de algodão e de outras fibras celulósicas (Andreaus, Ramos e Cavaco-Paulo, 2000).

As β -glicosidases possuem aplicações na indústria de bioetanol, de alimentos onde atuam na remoção de sabores amargos e adstringentes, como redutor de viscosidade, além de possuir grande potencial biológico no campo medicinal (Bhatia, Mishra e Bisaria, 2002).

O uso de resíduos lignocelulósicos visando a produção de etanol requer etapas sequenciais de pré-tratamento para desestruturação do material, sacarificação enzimática e fermentação. Contudo, algumas dessas etapas ainda são ineficientes e requerem investimentos em procedimentos e equipamentos, sendo que o maior obstáculo encontrado ao longo do processo de produção de bioetanol está relacionado à conversão das fibras que compõem a parede celular vegetal em açúcares simples, devido à recalcitrância desses materiais que impede a ação eficiente das enzimas. Parte desses problemas podem ser minimizados se houver métodos eficientes que facilitem o acesso da enzima às fibras, melhorem o desempenho das enzimas e reduzam os custos de produção das mesmas (Wei *et al.*, 2009).

Os resíduos agro-industriais utilizados são geralmente considerados os melhores substratos indutores de enzimas lignocelulolíticas. Na natureza, há muitos microrganismos capazes de crescer nesses materiais, principalmente os fungos filamentosos capazes de secretar enzimas que atuam na degradação da matriz lignocelulósica (Visser *et al.*, 2011).

A maioria das celulasas comerciais é produzida por fungos mesófilos, entretanto os processos industriais operam a altas temperaturas e a aplicação de enzimas produzidas por microrganismos termófilos parece mais vantajosa (Mamma *et al.*, 2009), uma vez que estes são capazes de produzir hidrolases com características como atividade ótima em temperaturas elevadas, termoestabilidade em uma ampla faixa de pH e altas taxas de hidrólise do substrato (Gomes *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2000).

Os fungos termofílicos produzem enzimas termoestáveis que são normalmente mais robustas, sendo mais resistentes ao pH e reagentes químicos em meios de reação, por sua vez, estas também promovem a hidrólise a altas temperaturas. A termoestabilidade enzimática é uma característica vantajosa, pois esta aumenta a velocidade de reação e diminui a contaminação por microrganismos mesofílicos do meio,

ocasionando melhoramento das técnicas e viabilidade econômica (Merheb-dini *et al.*, 2009).

O fungo termófilo *Myceliophthora thermophila* tem mostrado habilidade na degradação da biomassa vegetal quando cultivado em materiais lignocelulósicos, sendo relatada principalmente a produção de xilanases (Badhan *et al.*, 2007). Apesar disto ainda faltam estudos mais evidentes das condições que maximizem a produção de cada uma das enzimas e da potencialidade das mesmas na hidrólise de polissacarídeos, tanto na forma bruta como purificada.

Dependendo do tipo de estudo que se pretende realizar e do produto final que se deseja obter, o uso do extrato bruto obtido do cultivo de fungos pode influenciar negativamente nos resultados. Assim, uma saída para aumentar a eficiência catalítica, diminuir os produtos indesejáveis e aumentar a reprodutibilidade do processo seria a utilização de enzimas puras.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 A biomassa lignocelulósica

O teor, a proporção e a estrutura química dos diferentes componentes do lignocelulósico podem variar de acordo com sua espécie. Em geral são classificados em duros (*hardwood*) que são provenientes de angiospermas ou moles (*softwood*) proveniente de gimnospermas. (Fengel e Wegener, 1989, Higuchi, 1985)

As paredes celulares dos vegetais diferem de acordo com suas funções. Sua rigidez se deve a uma rede de microfibrilas entrelaçadas por uma matriz de proteínas e diferentes polissacarídeos (Figura 1). Os principais componentes da madeira são celulose, hemicelulose e lignina. Além desses, em muitas espécies, outros componentes químicos coletivamente chamados de extrativos estão presentes. A composição dos três principais componentes da célula vegetal varia, mas juntos eles correspondem cerca de 90% do seu peso seco (Wiselogle, Tyson e Johnson, 1996).

A célula vegetal deposita a sua parede em várias camadas. A primeira é a lamela média constituída principalmente de lignina depositada durante a divisão celular. Sobre a lamela média depositam-se as primeiras camadas de celulose formando as

microfibrilas que constituem a parede celular primária, que é continuamente depositada durante o crescimento em área da célula.

Após a fase de crescimento celular ser completada, a parede celular secundária é depositada apresentando maior homogeneidade em sua constituição. A microscopia desta camada revelou três diferentes estruturas constituídas de microfibrilas de celulose, depositadas em diferentes orientações nas regiões cristalinas (Fengel e Wegener, 1989).

Em geral as paredes celulares consistem basicamente de 50-80% de celulose, 5-30% de hemicelulose e 15-35% de lignina (Fengel e Wegener, 1989).

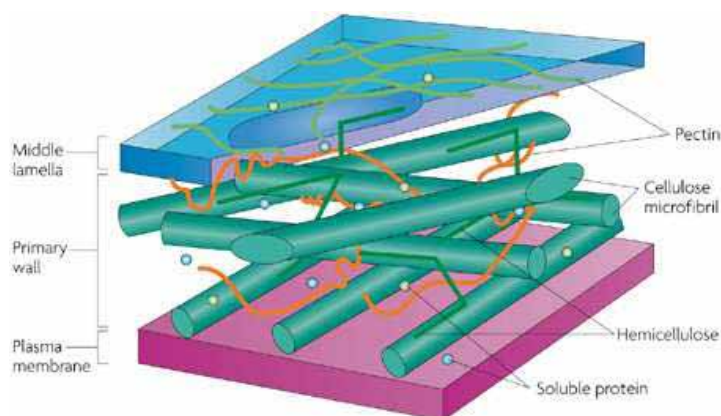


Figura 1. Esquema da parede celular vegetal (Sticklen, 2008).

A celulose, o maior componente do material lignocelulósico é o mais abundante polissacarídeo renovável da terra. Ela é um homopolímero linear de moléculas de glicose unidas por ligações β -1-4 ligadas por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, portanto sua estrutura supramolecular depende da estabilização decorrente de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (Fengel e Wegener, 1989). Estritamente a celulose é constituída por unidades monoméricas de celobiose (Figura 2).

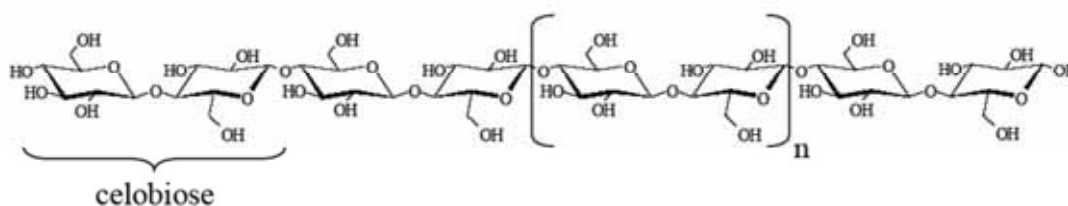


Figura 2. A estrutura da celulose (Martins, 2005)

Feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas, nas quais regiões cristalinas se alternam com regiões amorfas. As microfibrilas constroem fibrilas e estas as fibras celulósicas. Como consequência dessa estrutura fibrosa, a celulose possui alta resistência à tração e insolubilidade na maioria dos solventes (Fengel e Wegener, 1989).

Uma vez que a estrutura das fibras celulósicas naturais é bastante heterogênea, é lógico supor que existam regiões de variável acessibilidade aos reagentes químicos e/ou preparações enzimáticas. Na estrutura cristalina da celulose, todas as reações das microfibrilas se iniciam na superfície e continuam para o interior das mesmas. O inchamento da celulose aumenta a acessibilidade de reagentes e, como consequência, a reatividade. Por essa razão, geralmente utilizam-se soluções cáusticas para a indução desse fenômeno. Os pré-tratamentos para inchamento das fibras são práticas usuais na indústria de derivados de celulose. O inchamento, principalmente o intra-molecular, expõe as superfícies das fibrilas aos reagentes e assim cada fibrila reage ao longo de seu comprimento (Klock *et al.*, 2005).

A hemicelulose ou poliose, o segundo maior constituinte do lignocelulósico é composto pelos açúcares glicose, manose, galactose (hexoses), xilose e arabinose (pentoses) (Figura 3), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos ou desoxi-hexoses em alguns tipos de madeiras. Esses açúcares estão unidos por ligações glicosídicas β -1-4 e algumas vezes por β -1-3, apresentam-se na forma de heteropolímeros ramificados com menor grau de polimerização do que a celulose, atuando como uma interface entre a celulose e a lignina (Saha, 2003).

A estrutura primária das hemiceluloses depende de sua origem. Frequentemente duas ou três diferentes hemiceluloses ocorrem na mesma planta, mas em diferentes proporções (Kubicek e Pentilla, 1998). As hemiceluloses de gramíneas (Figura 4) e de resíduos de cereais são geralmente caracterizadas pela presença de arabinoxilanas e xiloglucanas, enquanto que o maior componente nas madeiras duras é a 4-O-metil-glucuronoxilanas e nas madeiras moles galactoglucomanana (Biely e Tenkanen, 1998).

Dentre as hemiceluloses a maior classe é a da xilana constituída de uma cadeia com ligações β -1-4 de unidades de xilose aleatoriamente substituída com 4-O-metil-D-glucurônico e L-arabinofuranose, e também com grupos acetil em madeiras duras. Como os demais polissacarídeos de origem vegetal, a xilana apresenta grande variabilidade química e molecular, tipos de ramificação e graus de polimerização que

varia de espécie para espécie, o que está relacionado às funções em cada uma das plantas resultando em propriedades físicas e químicas distintas (Puls e Schusei, 1993).

Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas, sendo portanto mais susceptíveis a hidrólise química sob condições mais brandas. Entre a celulose, lignina e as hemiceluloses ocorrem interações covalentes e não covalentes, as quais são importantes para adesão e coesão das fibras, manutenção da integridade da parede celular vegetal e proteção da celulose contra o ataque de celulases (Prade, 1995; Uffen, 1997; Beg *et al.*, 2001).

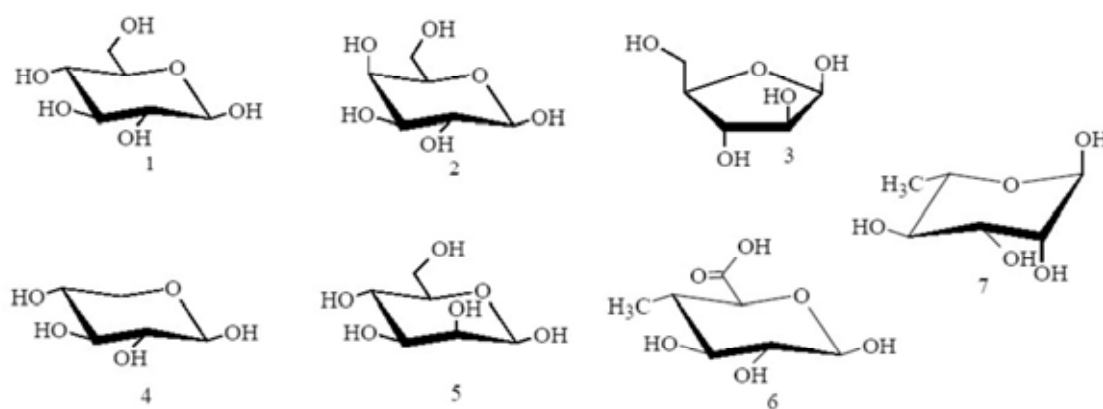


Figura 3. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. D-glicose (1), D-galactose (2), L-arabinose (3), D-xilose (4), D-manose (5), 4-O-metil-D-glucurônico (6), L-ramnose (7) (Martins, 2005)

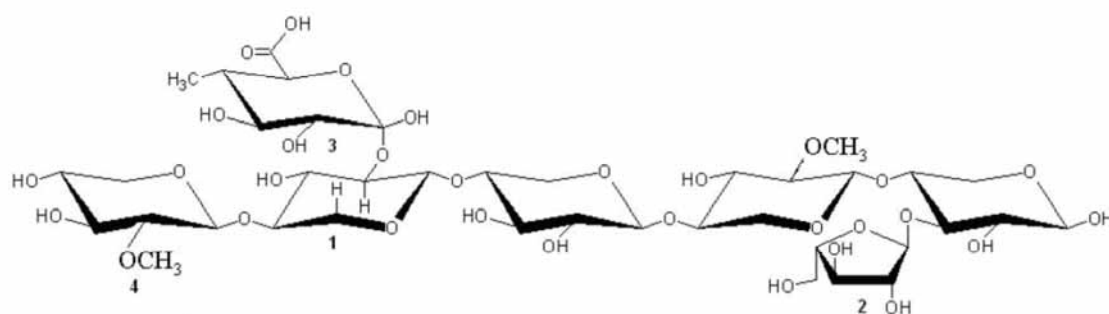


Figura 4. Representação esquemática de uma xilana de gramínea. 1,4 D-xilopirranose (1), L-arabinose (2), ácido 4-O-D-metil-α-glucurônico (3), grupo acetil (4) (Pitarello, 2007)

A lignina está presente nos materiais lignocelulósicos na proporção de 15 a 35% (Buranov e Mazza, 2008) agindo como material adesivo, agente de enrijecimento e barreira contra degradação enzimática ou microbiana da parede celular (Fengel e

Wegener, 1989). Ela é definida como uma matriz amorfa não polissacarídica cuja biossíntese resulta da condensação de várias formas ressonantes de radicais livres, gerados a partir da oxidação de derivados do álcool p-hidroxi-cinâmico com vários graus de metoxilação (Fengel e Wegener, 1989).

Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a vários tipos de ligações entre as unidades fenilpropano. Em contraste com a celulose e a hemicelulose, a lignina não é composta de unidades repetidas (Figura5).

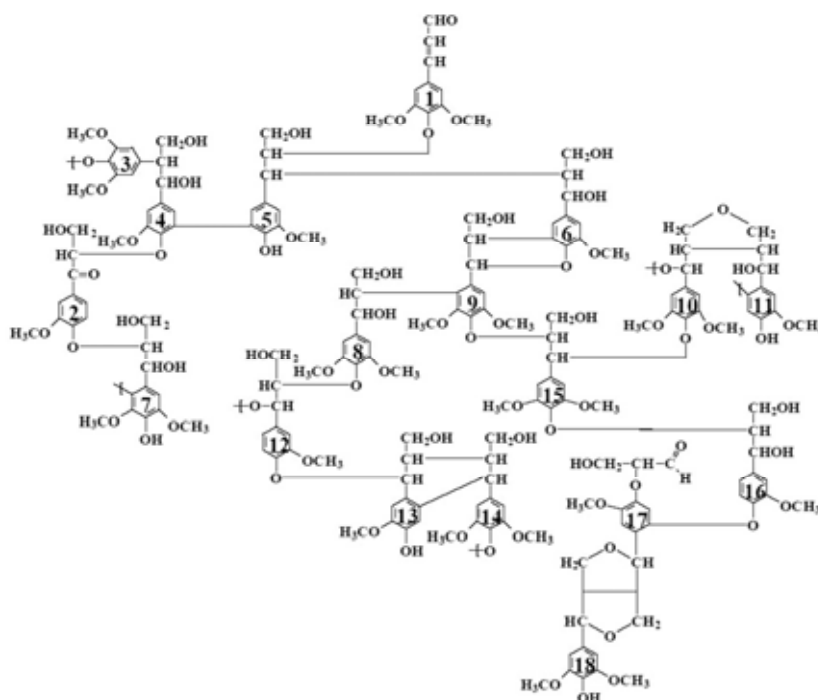


Figura 5. Modelo de uma estrutura de lignina (Fengel e Wegener, 1989).

Finalmente, os componentes de menor massa molar não residem na parede celular da planta e dividem-se basicamente em duas classes. A primeira engloba materiais conhecidos como extrativos por serem extraíveis em água, solventes orgânicos neutros ou volatilizados a vapor. A segunda classe são solventes não comumente extraíveis com os agentes mencionados, tendo como exemplo, compostos inorgânicos, cinzas, proteínas e substâncias pécticas. Esses constituintes são responsáveis por determinadas características da planta como a cor, o cheiro, a resistência natural ao apodrecimento, o sabor e suas propriedades abrasivas.

2.2 Enzimas envolvidas na degradação dos polissacarídeos presentes na parede celular dos vegetais

Devido à sua constituição física e ao fato de que na natureza a celulose ocorre sempre associada à lignina e a hemicelulose, a degradação completa dos materiais lignocelulósicos requer ações coordenadas de várias enzimas (Kubicek, 1992).

2.2.1 Celulases

As celulases são sintetizadas por uma grande diversidade de microrganismos durante seu crescimento em materiais celulósicos (Szijártó *et al.*, 2004).

A degradação da celulose ocorre pela ação de três classes principais de enzimas que atuam sinergicamente causando a hidrólise da celulose até glicose (Kuhad, Singh e Eriksson, 1997). Estas classes de enzimas hidrolíticas compreendem as endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), as exo-1,4- β -glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as 1,4- β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (Sinsabaugh e Liptak, 1997; Ubhayasekera *et al.*, 2005). Têm-se assumido como verdadeiro esse modelo de biodegradação de celulose para a maioria dos fungos, porém sabe-se que existem algumas espécies deficientes na produção de exo-1,4- β -glucanases e β -glicosidase, ficando limitada a biodegradação completa do polímero pela via enzimática (Kubicek, 1981).

Celulases e outras glicosídeo hidrolases (GHs) foram classificadas em famílias e estruturalmente relacionadas no banco de dados CAZy (www.cazy.org.br), baseadas nas sequências de similaridades de aminoácidos, tão bem quanto nos padrões de seus resíduos hidrofóbicos, do seus enovelamentos e mecanismos que tem sido constantemente atualizados nesse banco desde 1988 (Levasseur *et al.*, 2013). A eficiente degradação da celulose geralmente tem ao menos um membro da glicosídeo hidrolase da família 7 (Ubhayasekera *et al.*, 2005).

Algumas destas enzimas, são compostas por dois domínios distintos: um pequeno chamado módulo de ligação de celulose (CBM) que é conectado por uma cadeia polipeptídica flexível ao domínio catalítico (DC), que abriga o sítio ativo (SA). O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe das enzimas possui uma forma diferente de sítio ativo, permitindo a hidrólise de ligações localizadas em regiões distintas do substrato. O CBM está associado a adsorção da

enzima ao substrato, permitindo o aumento da concentração das celulasas na superfície da celulose através de interações não covalentes (Palonen *et al.*, 2004).

As exoglucanases (celobiohidrolases) atuam nas extremidades da cadeia de celulose, produzindo majoritariamente celobiose, além de glicose e celotriose (Zandoná filho, 2001). As exoglucanases principais são a CBH I e CBH II, que hidrolisam a cadeia de celulose a partir das extremidades redutora e não-redutora, respectivamente.

O sítio ativo das celobiohidrolases possui uma forma de túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando na sua maioria celobiose. O CBM é constituído por 35 aminoácidos, na CBH I e 44 na CBH II que promovem a adsorção da proteína ao substrato, permitindo melhor aproximação do polímero de celulose ao sítio ativo (Hui, White e Thibault, 2002). Essa adsorção ocorre através da interação de resíduos de tirosina do CBM com as unidades de glucopirranose presentes na celulose (Martins, 2005).

As endoglucanases clivam a cadeia de celulose aleatoriamente, criando novas extremidades de cadeia (Sánchez, 2009). Estas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celulosas quimicamente modificadas (solúveis), como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC). A celulose cristalina e o algodão, substratos com elevado grau de cristalinidade, são menos hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular que apresentam (Medve, 1997; Zandoná filho, 2001).

O sítio ativo das endoglucanases possui uma forma de chave, que possibilita a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduz seu grau de polimerização consideravelmente (Martins, 2005). As regiões amorfas, com menor organização estrutural, são mais facilmente atacadas, pois suas cadeias não possuem ligações intermoleculares de hidrogênio tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas. Assim, o ataque das endoglucanases leva a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose.

As exoglucanases não atuam sobre celulosas solúveis por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes (Martins, 2005), atuando sobre celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Deste modo, ensaios de atividade sobre Avicel e papel de filtro caracterizam as exoglucanases (Martins, 2005), enquanto que para a atividade de endoglucanases usa-se CMC (Sánchez, 2009), tornando possível a diferenciação entre essas enzimas.

As β -glicosidases, que não são consideradas celulasas legítimas por agirem sobre substratos solúveis, apresentam importantíssima contribuição para a eficiência da hidrólise da celulose por possuírem a função de hidrolisar a celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glicose, já que a celobiose é um potente inibidor competitivo das celobiohidrolases (Medve, 1997; Muñoz *et al.*, 2001), sendo seu acúmulo no meio reacional fator limitante para a incompleta hidrólise do polímero de celulose.

O sistema de classificação das β -glicosidases ainda não está bem definido, entretanto, é baseado na especificidade da enzima a seus substratos, sendo divididas em 3 classes: (1) aril- β -glicosidases, (2) celobiasas verdadeiras e (3) enzimas com ampla especificidade a substratos, na qual são ativas a uma grande faixa de substratos. Um outro esquema de classificação é baseado na similaridade das sequências e enovelamentos das β -glicosidases (Bhatia, Mishra e Bisaria, 2002).

As β -glicosidases estão classificadas como GHs famílias 1 e 3. Ambas compreendem enzimas que hidrolisam seus substratos com a conservação do carbono anomérico (Withers e Street, 1989), sendo as β -glicosidases da família 3 presentes em bactérias, fungos e leveduras.

A aplicação das β -glicosidases requer produção em larga escala e um detalhado conhecimento de seus mecanismos de reação. Para tal objetivo pesquisadores procuram entender as bases moleculares da extensa especificidade a substratos e características estruturais. A identificação de resíduos presentes no sítio ativo é de considerável importância para revelar a relação entre estrutura-função tão bem quanto o desenho de enzimas mutantes com características melhoradas (Bhatia, Mishra e Bisaria, 2002).

2.2.2 Hemicelulasas

As enzimas que hidrolisam a hemicelulose podem ser divididas em dois grupos, as que são capazes de degradar a cadeia principal e as que degradam as cadeias laterais (Kuhad, Singh e Eriksson, 1997). Portanto, a hidrólise das hemiceluloses ocorre de maneira aleatória, produzindo oligossacarídeos lineares e ramificados. Estes últimos podem apresentar cadeias laterais de arabinofuranose, ácido glucurônico ou ácido 4-O-metil glucurônico. Devido à complexa estrutura das hemiceluloses, diferentes tipos de enzimas são requeridos para a sua modificação e degradação. Um sistema, incluindo endo

e exoxilanases, mananases, β -xilosidades, α -glucuronidases e α -arabinofuranosidases, torna-se necessário para a hidrólise completa desses polissacarídeos (Biely, 1985). Formas múltiplas de cada classe de enzimas podem ocorrer e estas podem cooperar na hidrólise do substrato (Biely *et al.*, 1997; Wong, Tan e Saddler, 1988).

A atividade das xilanases é altamente dependente da presença de enzimas capazes de degradar as cadeias laterais. A hidrólise de diferentes xilanas por xilanases gera vários produtos, os quais se diferem pelas quantidades de xiloses, xilobioses e xilotriosos, assim como pela natureza dos açúcares substituídos.

A principal enzima para a despolimerização da xilana é a endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8). Sua ação ocorre na cadeia principal da xilana, gerando xilooligossacarídeos menores, substituídos ou não, que serão clivados pela exo-1,4- β -xilanase (Biely, 1985). Os substituintes são ao mesmo tempo liberados por esterases e glicosidases correspondentes, por exemplo: resíduos de α -L-arabinosil por α -L-arabinofuranosidade (EC 3.2.1.55) (Faulds *et al.*, 2006), resíduos de 4-O-metil-D-glucuronosil ou D-glucuronosil por α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), resíduos acetil por acetilesterases (EC 3.1.1.6). Enzimas acessórias como as feruloil esterases (FAE; EC 3.1.1.73) podem também agir com as xilanases para clivar as pontes ferúlicas e/ou diferúlicas entre as cadeias de xilana e a de lignina (Tabka *et al.*, 2006; Vardakou *et al.*, 2004). Os dímeros de xilose são geralmente clivados pela β -xilosidade (EC 3.2.1.37), liberando D-xilose como único produto da hidrólise. A β -xilosidade é importante quando a hidrólise completa da xilana é requerida (Biely, 1985). As hemicelulases também compõem a classe das glicosídeo hidrolases.

As ligações da hemicelulose não são todas equivalentes e igualmente acessíveis para as enzimas xilanolíticas. Além disso, a estrutura da hemicelulose também muda durante a hidrólise devido a retirada de substituintes e diminuição do tamanho da cadeia (Wong, Tan e Saddler, 1988).

As xilanases são classificadas como sendo principalmente GHs famílias 10 e 11, porém ainda são encontradas em menor número xilanases nas famílias 5, 7, 8 e 43, classificação que se baseia nas propriedades estruturais e na sequência de aminoácidos do domínio catalítico, como mencionado para as β -glicosidases (Collins, Gerday e Feller, 2005).

As xilanases da família 10 não são muito específicas hidrolisando além da xilana, uma série de outros substratos. Elas clivam a cadeia de xilana a partir do terminal

não-redutor e liberam xilose, xilooligossacarídeos lineares e ramificados, sendo mais ativas em xilooligossacarídeos de cadeia curta, indicando que contem sítio catalítico pequeno. Em geral, apresentam massa molecular maior do que 30 KDa e baixo ponto isoelétrico (Byely *et al.*, 1997; Collins , Gerday e Feller, 2005).

As xilanases da família 11 são consideradas xilanas verdadeiras, pois agem exclusivamente em xilanas, tendo portanto, pouca versatilidade catalítica. São mais atrativas em xilanas de cadeias longas e apresentam massas molares geralmente abaixo de 30 kDa e alto ponto isoelétrico (Collins , Gerday e Feller, 2005; Christakopoulos *et al.*, 2003).

Duas xilanases, Xil Ia e IIb foram isoladas quando sabugo de milho foi cultivado por fermentação sólida com o fungo termofílico *Myceliophthora* sp IMI 387099, suas massas molares foram aproximadamente iguais a 53 kDa e os pontos isoelétricos 5,2 e 4,8 respectivamente (Chadha *et al.*, 2004). Quando palha de arroz foi fermentada também em sistema sólido foram produzidas três xilanases, com 47, 41 e 30,1 kDa e pontos isoelétricos de 3,5, 4,8 e 5,2 respectivamente (Badhan, Chadha e Saini, 2008). Outro extrato proveniente de fermentação sólida em palha de arroz foi analisado por zimograma sendo detectadas seis isoformas de xilanase, já em palha de trigo quatro isorformas foram detectadas, três em sabugo de milho e bagaço e duas em farelo de trigo (Badhan *et al.*, 2004). Um outro trabalho também realizado por Badhan e colaboradores (2007) que avaliou o complexo enzimático celulolítico e hemicelulolítico do *Myceliophthora* sp IMI 387099 mostrou que o tipo de substrato usado influencia o número e a intensidade das isoformas expressas de endoglucanase e xilanase, neste a palha de arroz induziu quatro endoglucanases quando comparada a duas e a uma enzima induzida na presença de palha e farelo ambos de trigo, respectivamente.

2.2.3 Atividades Auxiliares

Décadas de pesquisas na degradação da parede celular de plantas tem progressivamente revelado as atividades enzimáticas envolvidas na lise da biomassa. As enzimas envolvidas na quebra dos polímeros de carboidratos e glico-conjugados estão classificadas no banco de dados CAZy (www.cazy.org.br) que atualmente incorpora mais de 300 sequências de famílias subdivididas em glicosídeo hidrolases (GHs), glicosiltransferases (GTs), polissacarídeo liases (PLs), carboidrato esterases (CEs) e

módulos de ligação de celulose (CBM). No entanto, um grande número de carboidrato oxidases tem sido identificadas, sendo proposto pela literatura dois tipos de sistemas degradadores da parede celular de plantas, (i) o sistema clássico hidrolítico responsável pela degradação de carboidratos e (ii) o sistema lignocelulolítico que envolve uma série de enzimas especificamente oxidativas que interagem de forma cooperativa e sinérgica ajudando o sistema enzimático hidrolítico (GHs, PLs e CEs) no ganho de acesso aos carboidratos encrustados na parede celular da biomassa (Horn *et al.*, 2012; Levasseur *et al.*, 2013).

Com isso, uma nova classe de enzimas chamada de Atividades Auxiliares (AAs) foi criada no banco de dados do Cazy, sendo esta uma extensa classe de módulos não estritamente restritos a um simples mecanismo catalítico ou específicos substratos, que são caracterizadas e atualizadas no banco de dados pelas suas relevâncias bioquímicas e similaridades com modelos considerados âncoras funcionais. A atual classificação das AAs é dividida em 11 famílias incluindo as subfamílias das famílias AA1, AA3 e AA5 (Tabela 1) (Levasseur *et al.*, 2013).

Dentre a nova AA classe, as LPMos anteriormente classificadas como GH61 (Harris *et al.*, 2010) e as celobiose desidrogenases (CDH) vem sendo as enzimas mais amplamente estudadas. Por um longo período de pesquisas as LPMos família AA9 foram reportadas por possuírem baixa atividade de endoglucanase, entretanto estudos reportaram que alguns membros da glicosídeo hidrolase família 61 podiam dinamizar a atividade de celulase resultando no aumento da conversão da biomassa vegetal (Merino e Cherry, 2007), aumentando o interesse da massa pesquisadora na resolução e entendimento dessa família.

GH61s de *Thielavia terrestris* (sinônimo de *M. thermophila* e *Sporotrichum thermophile*) e de *Thermoascus aurantiacus* identificadas como enzimas em ganho de conversão do lignocelulósico foram incorporadas ao genoma de *Trichoderma reesei* para se conseguir melhoramento na eficiência celulolítica (Harris *et al.*, 2010) e descobriu-se que o ganho em conversão é dependente da presença de íons metálicos, sendo o ganho eliminado quando a mistura contendo somente celulases hidrolíticas e GH61 foi aplicada sobre substratos compostos somente de celulose. Alguns trabalhos correlacionaram esses efeitos com o conteúdo de lignina e a atividade antioxidante dos materiais lignocelulósicos. Muitas hipóteses foram lançadas, mas

nenhuma definitiva resposta foi dada considerando a interpretação do aumento de conversão (Dimarogona, Topakas e Christakopoulos, 2013).

As CDHs são proteínas monoméricas que contêm FAD e o grupo prostético heme b localizados em dois distintos domínios conectados por um link móvel (Harreither *et al.*, 2011) e são capazes de solubilizar celodextrinas, manodextrinas e lactose eficientemente a suas correspondentes lactonas por um ciclo catalítico onde dois elétrons obtidos do sacarídeo são estocados no FAD e depois transferidos para dois aceptores de elétrons. A enzima usa um grande espectro de aceptores de elétrons incluindo quinonas, fenoxiradicais, Fe^{+3} , Cu^{+2} e o íon triiodino (Henriksson, Johansson e Pettersson, 2000). O exato papel biológico da CDH não está ainda totalmente elucidado, no entanto alguns trabalhos apontam para sua participação na degradação e modificação de polímeros de celulose, hemicelulose e lignina tanto pela geração de radicais livres via reação de Fenton (Kremer e Wood, 1992), quanto também atuando como um importante componente do sistema lignocelulolítico (Harreither *et al.*, 2011).

Tabela 1. Divisão das subfamílias e atividades da classe AA.

(Sub)famílias	Atividade	E.C.
AA1	Multicopper oxidase	
AA1_1	Lacase	1.10.3.2
AA1_2	Ferroxidase	1.10.3.2
AA1_3	Lacase-like multicopper oxidase	1.10.3.2
AA2	Class II peroxidase	
	Manganês peroxidase	1.11.1.13
	Lignina peroxidase	1.11.1.14
	Versatil peroxidase	1.11.1.16
AA3	GMC oxidoreductase	
AA3_1	Celobiose desidrogenase	1.1.99.18
AA3_2	Aril-álcool oxidase/Glicose oxidase	1.1.3.7/1.1.3.4
AA3_3	Álcool oxidase	1.1.3.13
AA3_4	Piranose oxidase	1.1.3.10
AA4	Vanilil álcool oxidase	1.1.3.38
AA5	Radical-copper oxidase	
AA5_1	Glioxal oxidase	1.1.3.-
AA5_2	Galactose oxidase	1.1.3.9
AA6	1,4-Benzoquinona redutase	1.6.5.6
AA7	Glicooligossacarídeo oxidase	1.1.3.-
AA8	Domínio de ferro redutase	
AA9	Lítica polissacarídeo monooxygenase (GH61)	1.-.-.-
AA10	Lítica polissacarídeo monooxygenase (CBM33)	1.-.-.-
AA11	Lítica polissacarídeo monooxygenase	1.-.-.-

Fonte: Levasseur, 2013 (atualizado pelo CAZy). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes.

Evidências da existência de um mecanismo entre as atividades de CDH e GH61 tem sido discutidos por Langston (2011) que avaliou a combinação das enzimas GH61 e CDH de *Thielavia terrestris* observando o aumento da conversão de celulose pelo coquetel contendo celulasas hidrolíticas, além da liberação de diferentes oligossacarídeos quando a mistura GH61 e CDH estava presente, demonstrando

evidências da presença do sistema celulolítico oxidativo em paralelo as celulases hidrolíticas (Langston *et al.*, 2011).

2.2.4 Sinergismo

O sinergismo ocorre quando o efeito de duas ou mais enzimas atuando em cooperação é maior do que o efeito de enzimas individuais. Estudos mostraram que a degradação da celulose cristalina não ocorre quando os componentes do sistema celulolítico estão presentes individualmente no meio, no entanto quando estão combinados agem de maneira sinérgica tornando a celulose solúvel. Ensaio realizados com o progresso cinético da hidrólise de algodão pela ação de celobiohidrolases, endoglucanases e combinações de CBH II com outras enzimas de *C. lucknowense* mostraram que enzimas individuais não puderam hidrolisar o algodão eficientemente (Gusakov *et al.*, 2007).

A extensão do sinergismo é geralmente expresso em termos do chamado grau do sinergismo, que é a razão da atividade observada da mistura enzimática pela soma das atividades dos componentes separados. O grau de sinergismo é dependente de vários fatores, incluindo o tipo de substrato, a natureza da celulase e a concentração dos componentes na mistura enzimática (Woodward, 1991). Quatro tipos de sinergismos tem sido reportados entre celulases de fungos: (1) endo e celobiohidrolase (2) duas celobiohidrolases distintas (3) entre β -glicosidase e endoglucanases e (4) entre β -glicosidase e celobiohidrolase (Zhang e Lynd, 2004).

Para a eficiente hidrólise da hemicelulose é necessária a ação sinérgica de enzimas que clivam tanto as cadeias principais quanto as laterais. Devido a hemicelulose apresentar estrutura heterogênea, o sinergismo entre as hemicelulases fica mais dificultado do que entre as celulases. Pode ocorrer também atuação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico com o hemicelulolítico, pois a suplementação do coquetel celulolítico com xilanase aumenta a digestibilidade da celulose presumivelmente devido as fibras de celulose ficarem mais expostas após a ação de enzimas do complexo hemicelulolítico.

Uma explicação satisfatória em relação as especificidades dos componentes do sistema hemicelulolítico, o seu modo de ataque e a significância da ação sinérgica têm levado a trabalhos consideráveis de clonagem de genes, análises de

seqüências e análises estruturais para celulases fúngicas e bacterianas (Archer e Wood, 1994).

2.3 Produção de enzimas por Fermentação Submersa

Atualmente os fungos filamentosos tornaram-se grande objeto de estudo devido as suas capacidades em produzir uma ampla faixa de enzimas e metabólitos com valores agregados a partir de resíduos agroindustriais. O problema encontrado é que os níveis de produção protéica por fungos em processos fermentativos apresentam baixos níveis de concentração alcançando poucos miligramas por litro de meio de cultura (Gouka, Punt e Van Den Hondel, 1997).

Estudos mostraram que o gene de expressão e secreção de proteínas fermentadas no estado sólido são muito diferentes daquelas produzidas em fermentação submersa (Iwaihiia *et al.*, 2002). Por exemplo, na fermentação submersa algumas atividades enzimáticas são encontradas principalmente na parede celular do micélio, entretanto em fermentação sólida essas atividades são observadas no meio, enquanto pequena atividade é observada na parede celular (Iwaihiia *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 1999), sugerindo que a secreção de proteínas é afetada pelas condições de cultura. Sabe-se que a via de secreção de proteínas realiza as funções de enovelamento e glicosilação e que a parede celular atua como uma barreira para as proteínas secretadas e muitas enzimas fúngicas são parcialmente associadas à parede celular (Gordon *et al.*, 2000; Archer e Peberdy, 1997).

Mesmo com alta secreção, uma considerável perda no rendimento da fração protéica pode ocorrer devido a degradação por proteases extracelulares, sendo este um dos maiores problemas em relação a eficiência da produção das proteínas heterólogas (Wang *et al.*, 2005). A repressão catabólica é um outro aspecto que deve ser analisado no desenvolvimento do bioprocessamento. Embora a maioria dos processos descritos seja em batelada, atenção tem sido dada ao processo descontínuo-alimentado com relatos de aumento da produção proteica ou então o emprego do processo contínuo que supostamente auxilia na redução da repressão a partir da remoção do açúcar redutor acumulado (Bailey e Tahtiharju, 2003; Ju e Afolabi, 1999; Schafner e Toledo, 1992).

Para melhorar a produção proteica, muitas estratégias têm sido desenvolvidas, entre elas o uso de ferramentas genéticas e modificações no

desenvolvimento e controle do bioprocesso. Na indústria, o sistema de fermentação submersa é geralmente o mais empregado devido as facilidades no aumento de escala, fácil manuseio e monitoramento dos parâmetros fermentativos que incluem o meio de cultivo, o inóculo, o pH, a temperatura, a agitação e a aeração que afetam significativamente o crescimento e a produção enzimática (Wang *et al.*, 2005; Singhania *et al.*, 2010).

2.4 Pré-tratamento da biomassa

Materiais lignocelulósicos são muito resistentes ao ataque enzimático, desta maneira pré-tratamentos são realizados nos mesmos para se tentar aumentar a degradabilidade enzimática. O alvo do pré-tratamento é modificar a estrutura do lignocelulósico e remover hemicelulose e/ou lignina, assim reduzindo a quantidade de enzimas necessárias para a hidrólise e favorecer o acesso das enzimas a microfibrila de celulose (Jeoh *et al.*, 2007).

Vários tipos de pré-tratamentos, incluindo tratamentos físicos, biológicos, químicos e a combinação destes tem sido investigada (Duff e Murray, 1996; Alvira *et al.*, 2010). Os métodos mais avaliados até agora são explosão a vapor, tratamento alcalino usando lime ou amônia, fibra explodida por amônia (AFEX), oxidação úmida e tratamento com ácido diluído. Tratamento alcalino e AFEX principalmente removem parte da lignina e são eficientes para resíduos agroindustriais. Por outro lado, explosão a vapor, oxidação úmida e o tratamento com ácido diluído atuam principalmente na fração da hemicelulose, e são usados tanto para pré tratar resíduos agroindustriais quanto madeira (Rocha *et al.*, 2011). Na explosão a vapor, uma das técnicas mais utilizadas, a biomassa é sujeita a um vapor saturado a alta pressão e a altas temperaturas (~200°C) por um certo período de tempo, ocorrendo a hidrólise da maior parte da hemicelulose. Em adição, a lignina pode também ser parcialmente hidrolisada por catálise ácida ou alcalina.

De maneira geral os pré-tratamentos químicos têm recebido mais atenção devido aos físicos serem relativamente ineficientes e os combinados raramente melhorarem a digestibilidade (Rabelo, Maciel Filho e Costa, 2008).

Desde que diferentes materiais lignocelulósicos possuem diferentes características físico-químicas, é necessário adotar a adequada tecnologia baseada nas propriedades da biomassa bruta. Além disso, a escolha de certo pré-tratamento tem um

grande impacto em todos subsequentes passos em termos da digestibilidade da celulose pelo complexo enzimático, da geração de compostos tóxicos potencialmente inibitórios para o coquetel de enzimas, para leveduras na fermentação alcoólica, além da demanda de energia no processo de downstream e no tratamento da água residual (Alvira *et al.*, 2010).

2.5 Cinética enzimática

2.5.1 Aspectos gerais

Baseando-se em Doran (2002), Blanch e Clark (1997) e Dixon e Webb (1979), a cinética de um grande número de enzimas pode ser predita pelo modelo matemático de Michaelis e Menten. Neste tipo de modelo, encaixam-se as reações onde há saturação a um determinado valor de substrato oferecido, ou seja, não há incremento na velocidade de reação independente do aumento de substrato. Porém, quando a partir de um determinado valor, a quantidade de substrato causa inibição na velocidade da reação, o modelo pode ser predito pela equação 01:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[S]}{K_i} \right) + K_m} \Leftrightarrow \frac{v_{\max}}{1 + \frac{[S]}{K_i} + \frac{K_m}{[S]}} \quad (01)$$

Para altas concentrações de substrato, tem-se que $1 + \frac{[S]}{K_i} \gg \frac{K_m}{[S]}$ e a equação (01) torna-se inversamente dependente da concentração do substrato assumindo a forma: $v = \frac{V_{\max}}{1 + [S]/K_i}$. No intervalo em que [S] é menor que o valor da constante de inibição K_i , a equação assume a forma predita pelo modelo de Michaelis-Menten podendo-se assim obter os parâmetros $V_{\max}$ e K_m . O ponto onde a primeira derivada é nula indica o valor S^* correspondente ao ponto de inflexão que possibilita o cálculo de K_i , uma vez que:

$$y = \frac{ax}{b+x+x^2/c} \rightarrow \frac{dy}{dx} = \frac{a(b-\frac{x^2}{c})}{\left(b+x+\frac{x^2}{c}\right)^2}, \text{ podemos aplicar a equação (02) obtendo ao final:}$$

$$\frac{dv}{dS} = 0 \rightarrow S^* = \sqrt{K_m \cdot K_i} \quad (02)$$

Os parâmetros cinéticos podem ser obtidos através dos dados experimentais por métodos de linearização como os de Lineweaver-Burk ou Eadie-Hofstee, onde cada um destes apresentam seus limites e indicações.

O método de Lineweaver-Burk citado por Dixon (1979) é um dos métodos mais empregados e sua precisão é indicada para altos valores de substrato e para o cálculo de $V_{\max}$.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (03)$$

A regressão linear obtida é do tipo $\frac{1}{v} = a \cdot \frac{1}{S} + b$, onde a inclinação da reta corresponde ao termo $\frac{K_m}{v_{\max}}$ e a intersecção com o eixo y o valor $\frac{1}{v_{\max}}$.

2.5.2 Cinética de desnaturação/desativação e tempo de meia-vida

As enzimas são macromoléculas estruturalmente complexas, sendo susceptíveis a desestabilização até mesmo por forças fracas. A desativação e até a desnaturação ocorrem por diferentes causas e são dependentes das condições do pH, forças iônicas e mecânicas, substâncias adicionadas a solução de enzima e a temperatura (Doran, 2002; Cornish-Bowden, 1995).

Considerado um modelo de primeira ordem de desnaturação enzimática, pode-se descrever:

$$\frac{-dU_t}{dt} = r_d = k_d \cdot U_t \quad (04)$$

onde, r_d corresponde a taxa de desnaturação (U/t), U_t é a atividade enzimática em um determinado momento e k_d é a constante da taxa de desnaturação ($1/t$). Por integração é obtido:

$$U_t = U_{t_0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (05)$$

sendo U_{t_0} a atividade enzimática inicial.

Um parâmetro imprescindível para avaliar a termoestabilidade enzimática é o cálculo do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), que corresponde ao intervalo de tempo necessário para que a enzima tenha sua atividade reduzida a 50% da atividade inicial, a uma dada temperatura. Partindo-se da equação (05) têm-se:

$$\ln\left(\frac{U_t}{U_{10}}\right) = -|k_d| \cdot t \quad (06)$$

e considerando a definição do tempo de meia-vida, a equação para a determinação do tempo de meia-vida é obtida:

$$t_{1/2} = \frac{0,6931}{k_d} \quad (07)$$

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática é de extrema importância. Em baixas temperaturas observa-se um aumento proporcional entre velocidade de reação e temperatura, mas a partir de um determinado ponto a velocidade de reação diminui proporcionalmente ao aumento da temperatura o que equivale a dizer que quando a temperatura do meio se encontra na faixa considerada ideal para a estabilidade da enzima, suas moléculas ocuparão uma distribuição conformacional específica. Com o aumento da temperatura essa distribuição estável deixa de existir afetando a afinidade da enzima pelo substrato, uma vez que a mobilidade faz parte da sua funcionalidade. Portanto em temperaturas baixas a enzima move-se com dificuldade ao substrato, reduzindo a eficiência da catálise; e se a temperatura é muito alta perde-se a estrutura ideal reduzindo a especificidade da enzima ao substrato (Fields, 2001).

O ponto de transição entre estas duas inclinações corresponde à temperatura ótima para a reação enzimática. A fase de aumento proporcional é determinada de fase de ativação térmica, e a fase de declínio trata-se da inativação térmica ou desnaturação térmica. Ambas podem ser matematicamente expressas de acordo com a equação predita por Arrhenius:

$$k_d = A_d \cdot e^{-E_{ad}/RT} \quad (08)$$

definindo o subscrito “a” como referente a fase de ativação enzimática e “d” referente a desativação ou ativação da desativação, podendo assim reescrever a equação (08) de acordo com a fase a que faz referência. Portanto, k_a e k_d corresponderiam a constante de

ativação ou de desnaturação; A_a e A_d equivaleria a constante de Arrhenius e E_a e E_{ad} a energia requerida para promover a ativação térmica ou a ativação da desnaturação térmica; R a constante dos gases ideais e T a temperatura absoluta (Cornish-Bowden, 1995).

Os dados experimentais obtidos durante o acompanhamento da estabilidade enzimática podem ser linearizados de acordo com metodologia proposta por Arrhenius estabelecendo graficamente a relação $\ln(k_d)$ versus $1/T$ partindo-se da equação (08), obtendo assim uma regressão linear dos pontos experimentais (equação 09). Esta regressão permite o cálculo direto do valor E_{ad} através da inclinação da equação obtida.

$$\ln(k_d) = \left[-\frac{E_{ad}}{R} \right] \cdot \frac{1}{T} + \ln(A_d) \quad (09)$$

3. Objetivos

Neste trabalho foram desenvolvidos processos fermentativos conduzidos em batelada e batelada alimentada para a produção de enzimas do fungo termotolerante *M. thermophila* M..7.7 empregando diferentes tipos de biomassas, in natura, pré-tratadas e comerciais, para a avaliação do repertório enzimático do microrganismo, buscando o melhor entendimento das proteínas envolvidas na biodegradação assim permitindo o desenvolvimento de novas técnicas para a indústria sucroalcooleira sendo o objetivo final e principal alcançar maior rendimento em glicose após a hidrólise enzimática.

Devido a β -glicosidase ser uma enzima que limita a conversão da biomassa devido a inibição de celobiohidrolases por seu próprio produto, o trabalho também teve como objetivo isolar, caracterizar a bioquímica e a cinética enzimática de uma β -glicosidase de *M. thermophila* M.7.7., avaliando sua possível aplicação como enzima suplementar a coquetéis enzimáticos que atuam na bioconversão do material lignocelulósico.

4. Materiais e métodos

4.1 Produção das enzimas

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE e o Departamento de Física da Universidade Estadual Paulista – UNESP de São José do Rio Preto-SP. A linhagem selvagem de *Myceliophthora thermophila* M.7.7. investigada foi proveniente do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada da UNESP de São José do Rio Preto-SP.

4.1.1 Substratos

Como substratos foram utilizados bagaço de cana-de-açúcar explodido (BEX), bagaço de cana-de-açúcar explodido e deslignificado (BED), celufloc (EC), farelo de trigo (FT), glicerol, lactose, sacarose e fosfofrutooligossacarídeos (FOS). Foram feitas suplementações entre as fontes de carbono citadas. As condições dos pré-tratamentos e as composições de todos os bagaços de cana-de-açúcar empregados estão discutidos em Rocha (2011).

4.1.2 Meio de cultivo para placa de petri

Foi utilizado o meio nutriente conforme descrito por Mandels e Sternberg (1976) com pequena modificação: 1,0% dos diferentes substratos citados no item 4.1.1; 0,14% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,20% de KH_2PO_4 ; 0,03% de CaCl_2 ; 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,50% de peptona; 0,20% de extrato de levedura; 0,03% de uréia; 0,10% de solução de sais (5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,4mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,0mg/L CoCl_2); 0,2% glicose e 2% ágar bacteriológico. Uma alíquota do microrganismo foi transferido ao centro da placa de petri com o auxílio de uma alça de platina e mantido em estufa à 45 °C durante uma semana.

4.1.3 Solução Nutriente

Foi empregada solução nutriente contendo 3,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,0 g/L KH_2PO_4 ; 0,5 g/L de MgSO_4 ; 0,5 g/L de CaCl_2 ; 0,1% Tween 80 e o pH foi ajustado para 5,0. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min.

4.1.4 Preparo do pré-inóculo

O *M. thermophila* M.7.7. foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 1% de glicose e celufloc, 0,1% Tween 80, 0,1% de peptona e o pH ajustado para 5. Uma suspensão de micélio foi obtida pela raspagem da placa de petri com solução Tween 80 a 0,1%, sendo então a solução de esporos juntamente com a solução de sais adicionadas ao pré-inóculo, o volume de ambas soluções foram 10% do volume final do pré-inóculo (200 mL geralmente). O pré-inóculo foi mantido sob incubação a 45 °C e 250 rpm durante dois dias. Todo o material foi autoclavado à 121 °C por 30 min.

4.1.5 Fermentação líquida em frascos agitados

Foram preparados frascos Erlenmeyers de 1 L na mesma concentração das substâncias que constituem o pré-inóculo. Neles foram adicionados 10% do volume final (200 mL) de pré-inóculo e da solução de sais, sendo então incubados em shakers com agitação de 250 rpm à 45 °C por 5 dias. A cada 24 horas uma amostra foi retirada, centrifugada por 12000 rpm à 10 °C durante 30 minutos e o sobrenadante analisado para as atividades de celulasas, xilanases, β -glicosidase e teor de proteínas totais. Todas soluções foram autoclavadas nas mesmas condições do pré-inóculo.

4.1.6 Fermentação em biorreatores com tanque agitado

Fermentadores Bioflo 115 de 2 L (New Brunswick Scientific Co, USA) equipados com controles automáticos de temperatura, pH, agitação, aeração e volume foram inoculados com 10% (v/v) de pré-inóculo. Ao fermentador foram adicionados a fonte de carbono, Tween e peptona nas mesmas proporções empregadas nos pré-inóculos. O volume de trabalho foi 1,6 L, a temperatura foi mantida à 45 °C. A taxa de aeração foi ajustada garantindo que o oxigênio dissolvido não atingisse nível menor do que 30% de saturação de ar no meio de cultura. O pH foi controlado por valores pré ajustados pelo uso de 0.4 M H₂SO₄ e solução de NH₄OH (3:1). A espuma foi controlada pela adição manual do anti-espumante polipropileno glicol P 2000 previamente esterilizado. Durante os ensaios amostras foram retiradas e centrifugadas por 12000 rpm à 10 °C durante 30 minutos e o sobrenadante analisado para as atividades de FPases, xilanases, β -glicosidase

e teor de proteínas totais. Todas as soluções foram autoclavadas nas mesmas condições do pré-inóculo.

4.2 Determinação das atividades enzimáticas

4.2.1 FPase

A atividade de FPase foi determinada por metodologia adaptada de Ghose (1987) em tubos de ensaio com 3 mg de papel de filtro Whatman nº 1, 100 µL de tampão citrato 50 mM pH 4,8 e 50 µL da solução enzimática. A reação foi mantida por 1 hora à 50 °C, quando então foi interrompida pela adição de 300 µL do reagente DNS (ácido 1-3-dinitrosalicílico). Em seguida a reação foi aquecida à 98 °C durante 5 minutos e 2 mL de água foram adicionados para posterior leitura da absorbância a 540 nm. O açúcar redutor liberado foi quantificado a partir da curva padrão de glicose previamente estabelecida. Uma unidade de FPU/mL foi calculada como sendo 0,37/concentração da enzima necessária para liberar 0,2 mg de glicose.

4.2.2 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada em mistura de reação contendo 10 µL da solução enzimática, 40 µL de tampão citrato 50 mM pH 4,8 e 50 µL de solução de xilana 0,50%. A reação foi mantida à 50 °C por 10 minutos e interrompida pela adição de 100 µL do reagente DNS seguida pelo aquecimento à 98 °C para a quantificação dos açúcares redutores liberados (Miller, 1959), a partir da curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose por minuto, sob as condições citadas.

4.2.3 β-glicosidase

Para a determinação da atividade de β-glicosidase, 20 µL da solução enzimática foram adicionados a 80 µL de 4-p-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo 1 mM (p-β-NPG), Sigma. A reação foi mantida à 50 °C por 10 minutos, quando então foi interrompida com 100 µL de solução de Na₂CO₃ 1 M. O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de nitrofenol por minuto de reação.

4.2.4 Preparo do reagente de DNS

O reagente de DNS é preparado dissolvendo-se completamente 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio, em 1,4 L de água destilada. A seguir, adiciona-se 300 g de tartarato de sódio e potássio, 7,6 g de fenol (aquecido à 50 °C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio. O volume é acertado para 1,5 L, filtrado e armazenado em frasco âmbar (Miller, 1959)

4.3 Dosagem de proteínas totais

Proteínas totais foram medidas em microplacas usando reagente comercial Bio-rad (Bio-rad laboratories, Hercules, CA), na qual é baseado no método de Bradford (Bradford, 1976). A albumina bovina foi usada como padrão.

4.4 Purificação das enzimas produzidas por *Myceliophthora thermophila* M.7.7.

O extrato enzimático centrifugado foi concentrado em *hollow fiber system* com corte de 10 kDA (Millipore, USA) junto com a troca do meio de cultivo para o tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mM pH 8.0 empregado na primeira etapa de purificação por cromatografia de troca iônica em resina Resource Q. A amostra foi carregada a 1 mL/min e a eluição foi feita com o mesmo tampão contendo NaCl 1 M. As frações contendo atividade de β -glicosidase foram unidas e concentradas usando o mesmo tampão, no entanto contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 M, que então foi aplicada na coluna de fenil sepharose (HIC), equilibrada com o tampão salino. A eluição foi feita a 50 e 0% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, obtendo-se portanto dois picos. O pico ativo para atividade de β -glicosidase foi concentrado e aplicado em Sephadex G-75, obtendo-se a β -glicosidase pura. Todos os passos foram avaliados por eletroforese não desnaturante (Weber e Osborn, 1969) e zimogramas. Todas as cromatografias foram feitas aplicando o equipamento AKTA Purifier upc 10 (GE healthcare) avaliando o protéico das amostras pela medição da absorbância a 280nm. A β -glicosidase pura foi denominada MTbgl3b.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil protéico foi analisado sob condições desnaturantes na presença de sulfato de duodecil e sódio (SDS) de acordo com a técnica segundo Laemmli (1970). Os géis de poliacrilamida foram preparados na concentração de 12% com tampão Tris/HCl, solução de acrilamida/bisacrilamida, solução TEMED, água destilada e solução de SDS 10% (Alfenas, 1991). A cuba para eletroforese foi preenchida com tampão Tris/glicina pH 8,9 com 1% SDS. As amostras para a corrida foram preparadas tomando-se em um Eppendorf 30 µL de cada amostra e 10 µL do tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0, contendo 1% de 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05% em água e 1 gota de glicerol. As amostras foram injetadas no gel de eletroforese e após a corrida, as bandas foram reveladas em soluções de prata ou de coomassie blue. O tamanho das proteínas foi estimado por comparação com um padrão proteico.

4.6 Zimograma

Para revelação específica das enzimas com atividade β -glicosidase o gel SDS-PAGE foi preparado com algumas modificações. Para revelação específica de β -glicosidase foi realizada com Esculina 98% à 0,1% e cloreto férrico à 0,03%, de acordo com (Kwon *et al.*, 1994) sendo o gel utilizado o mesmo confeccionado para a revelação do extrato protéico SDS-PAGE.

4.7 Ensaios padrões para a caracterização bioquímica e cinética da β -glicosidase

As simples curvas de pH e temperatura foram realizadas aplicando a faixa de pH entre 2,0 e 10 e de temperatura entre 30 e 80 °C, respectivamente. O ensaio padrão de β -glicosidase foi realizado conforme item 2.2.3 para o efeito da temperatura e do pH, empregando-se para o efeito do pH o tampão McIlvaine-glicina.

A estabilidade térmica do extrato enzimático bruto e da MTbgl3b purificada foi avaliada a 50, 60, 70 e 80 °C em diferentes tempos de incubação, sendo os ensaios realizados a pH 5,0 e 7,4. A amostra foi mantida em gelo até a avaliação da atividade enzimática remanescente. As atividades residuais foram medidas em ensaio

padrão e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da MTbgl3b foi calculado usando uma abordagem matemática previamente descrita (Aguiar-Oliveira e Maugeri, 2011).

A especificidade da MTbgl3b foi avaliada também utilizando o ensaio padrão de β -glicosidase. Dez diferentes substratos de p- β -nitrofenol derivados, polissacarídeos (comprados na melhor fonte possível, Sigma Aldrich e Megazyme) foram analisadas em 60 minutos de reação e os substratos celulósicos foram ensaiados em 14 horas. A hidrólise de polissacarídeos e substratos celulósicos foram medidas pelo método de DNS (Miller, 1959) e celobiose e lactose pelo método de glicose oxidase/peroxidase usando um kit comercial. Os efeitos de vários íons na concentração final de 10 mM, e de compostos químicos caotrópicos foram avaliados sob ensaios padrão. Os parâmetros cinéticos do extrato bruto e MTbgl3b foram estimados em doze concentrações de p- β -NP-glucopiranosídeo (p- β -NPG), desde 0,05 a 6 mM e em dez concentrações de celobiose na faixa de 0,25 a 6 mM. A glicose foi o substrato inibidor e o ensaio de inibição foi realizado apenas com p- β -NPG como substrato aplicando concentrações de glicose até 40 mM. As constantes cinéticas foram avaliadas utilizando a abordagem de Michaelis-Menten e calculadas por ajuste de mínimos quadrados do modelo cinético utilizando GraphPad Prism versão 5.00 (EUA).

4.8 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada em EC, BIN, BEX e BED a uma concentração final de 5% (p/v) de sólidos totais em frascos Erlenmeyer de 125 mL. 50 ml do extrato enzimático bruto proveniente da fermentação de BIN que corresponde a concentração total de 0,05 mg de proteína total/g de glucano foi a quantidade total de proteína carregada e operada à 50 °C, aplicando uma velocidade de agitação de 200 rpm. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Foram retiradas amostras às 0, 6, 12, 24 e 48 h e as concentrações de glicose, celobiose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico (g/L) foram medidas pelo sistema HPLC Dionex Ultimate 300 equipado com detector de índice de refração (HPLC-IR) e coluna Aminex®HPX-87H que foi eluída com 5 mM de H₂SO₄ a 0,6 mL/min. Açúcares e ácidos em amostras controle contendo apenas o respectivo substrato e tampão citrato 50 mM pH 5,0 também foram analisadas. Todas as amostras foram filtradas através de um filtro Millex mM TM 0,22 antes da análise. A conversão geral foi calculada a partir da soma das

concentrações finais de glucose e de celobiose em cada substrato empregado relacionada ao rendimento teórico do respectivo substrato.

4.9 Fingerprinting do secretoma de *Myceliophthora thermophila* M.7.7. empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

Para a análise do secretoma por LC-MS/MS 100 µg de proteína total foi aplicada a um gel SDS-PAGE 10%. A amostra foi corrida até 2 cm no gel de separação, corada com coomassie blue e as bandas proteicas foram recortadas e reduzidas com Tris (2-carboxietil) fosfina, alquiladas por 2- iodoacetamida e digeridas durante 6-16 horas com 8 ug/ml de tripsina utilizando tampão de bicarbonato de amônio para serem analisadas por LC-MS/MS, utilizando o equipamento LTQ-Orbitrap XL Hibrid (Thermo Scientific). Os arquivos gerados foram comparados a banco de dados NCBI *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 e executados via Mascot Ions Search software (Matrix Science, Reino Unido) e Scaffold Proteome Software Inc. (Portland, OR), com um limiar de proteínas e peptídeos de 5% FDR e 99%, respectivamente.

5. Resultados e Discussão

5.1 Fermentação submersa

5.1.1 Influência das fontes de carbono no sistema de produção de enzimas hemicelulolíticas em shaker

Para avaliar a produção de celulasas, xilanases e β -glicosidases, uma série de substratos e suplementos foram testados em fermentação submersa até o tempo final de 120 horas. Entre as diferentes fontes testadas, o bagaço explodido (BEX) na concentração de 1% foi o melhor indutor para a produção de celulasas totais entre 48 e 72 horas de cultivo, seguida da mistura BEX suplementado com lactose na proporção 3:1, em 72 horas. Notou-se que a mesma suplementação com lactose mas na proporção de 1:1 apresentou baixa atividade durante toda a cinética enzimática (Figura 6A). De acordo com Ubhayasekera (2005), a lactose inibe competitivamente celobiohidrolases devido à molécula ser quimicamente diferente da glucose somente na configuração do carbono

quatro na unidade galactosil. Oberson e colaboradores (1992) realizaram investigação comparativa em diferentes linhagens do fungo *Myceliophthora thermophila* não sendo observado crescimento, nem eficiência na produção de enzimas celulolíticas quando a lactose foi usada como fonte de carbono.

Farelo de trigo, celufloc e BEX suplementado com glicerol e sacarose não induziram a produção de FPases obtendo perfis semelhantes de produção. EC, BEX suplementado com lactose e com frutooligossacarídeos (FOS) reprimiram a síntese das mesmas.

As melhores fontes de carbono para a produção de xilanase foram BEX suplementado com FOS e também com lactose. A maior atividade foi alcançada em 48 horas quando BEX e FOS foram incubados na concentração de 1% (Figura 6B). O FOS é composto de kestose, nistose e frutofuranosil nistose que são polímeros derivados da sacarose constituídos de séries homólogas de oligo e polissacarídeos não-redutores de frutoses unidas geralmente por ligações β (2-1) e β (2-6) ligadas a uma molécula de glicose ou sacarose no caso do frutofuranosil. (Souza *et al.*, 2005; Duchateau *et al.*, 1995). Badhan (2007) também observou em fermentação submersa com o termofílico *Myceliophthora* sp. IMI 387099 aumento na expressão de xilanases em meio contendo xilana suplementada com frutose indicando que este monossacarídeo regula positivamente a expressão destas enzimas quando comparado com outras fontes de carbono. Em meios contendo somente frutose, após 48 horas de cultivo, ocorreu diminuição da atividade xilanolítica, enquanto que quando xilana e frutose foram fermentadas ocorreu acréscimo na atividade, fato que sugere o definido papel dos produtos de transglicosilação na expressão de xilanases múltiplas por *Myceliophthrora* sp (Badhan *et al.*, 2007).

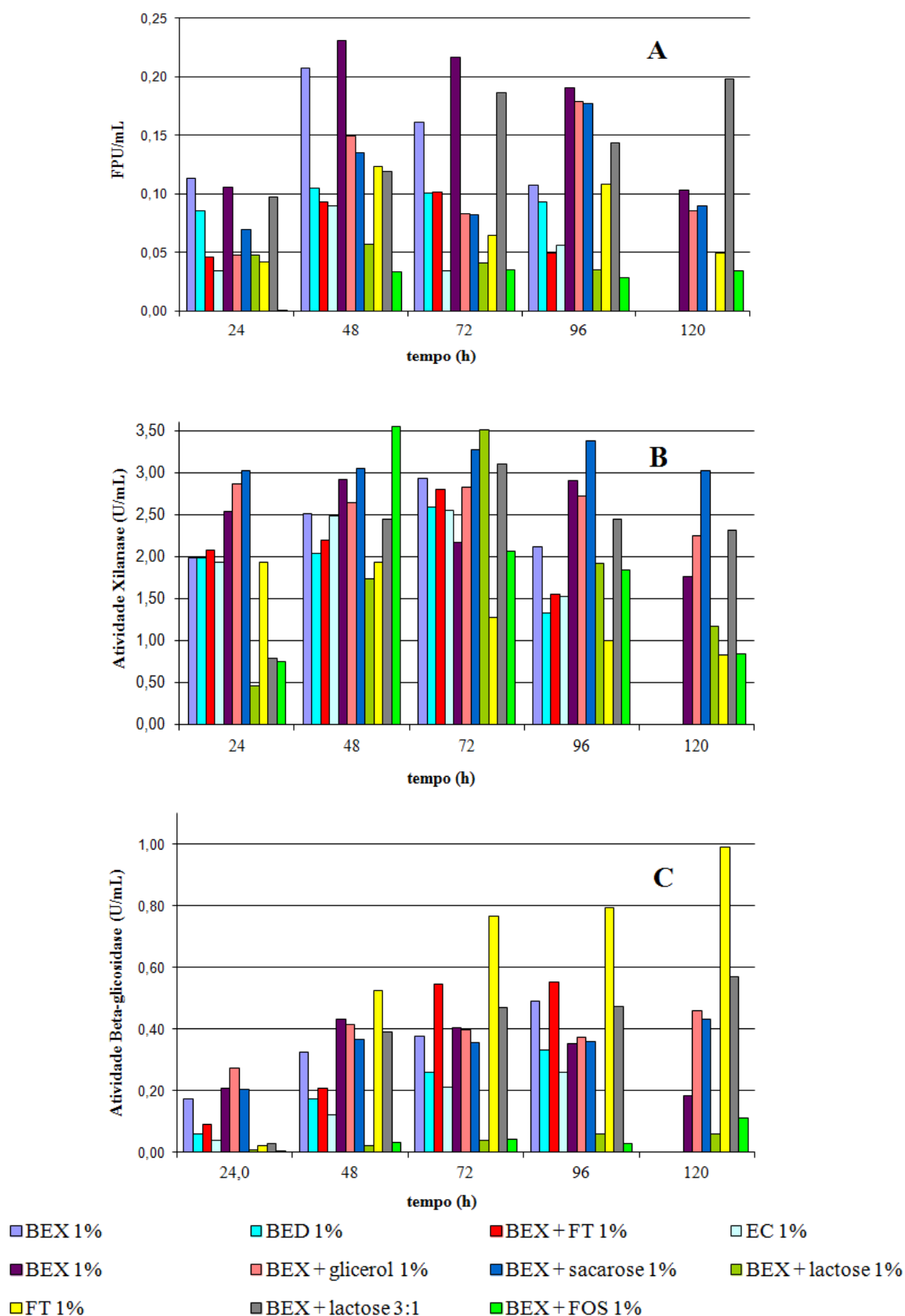


Figura 6. Atividade enzimática de FPases (A), xilanases (B) e β -glicosidases (C) em diferentes fontes de carbono em até 120 horas de cultivo.

Em 48 horas de fermentação com *M. thermophila* M.7.7. a atividade de xilanase foi de 3,5 U/mL empregando BEX e FOS como fonte de carbono, valor que corrobora com Badhan (2007) quando *Myceliophthora* sp IMI 387099 foi cultivado em fermentação submersa com frutose e xilana como fontes de carbono.

A segunda melhor fonte foi BEX e lactose também a 1% com máxima produção em 72 horas. Quando a proporção BEX e lactose foi 3:1 a atividade de xilanase foi reduzida, indicando que o dissacarídeo atua como indutor positivo na produção de xilanases, já que a lactose possui ligação glicosídica similar ao polímero de xilana β (1-4).

BEX, BEX suplementado com sacarose e BEX suplementado com glicerol forneceram produção estável durante toda a produção enzimática (Figura 6B). Badhan (2007) também não observou efeito repressivo na produção de xilanases com a adição de glicerol. Celufloc, BEX com farelo de trigo e BED apresentaram perfil semelhante e menores atividades xilanolíticas. Com farelo de trigo observou-se redução na atividade de xilanase após as 48 horas de cultivo.

A síntese de β -glicosidase foi induzida quando farelo de trigo a 1% (p/v) foi fermentado, seguida pela suplementação do BEX com farelo de trigo a partir de 72 horas (Figura 6C). Segundo Singhanian (2011) o farelo de trigo é uma fonte rica em nutrientes contendo proteínas, celulose, amido e minerais e podem promover ganho em crescimento e produção enzimática.

BEX, BEX suplementado com lactose (3:1), com glicerol e com sacarose, separadamente, apresentaram perfis semelhantes com atividades praticamente constantes após 48 horas. Como observado para as FPases as suplementações do BEX com FOS e com lactose, a 1%, reprimiram a síntese de β -glicosidase.

Aspergillus niger NII 08121 também mostrou máxima atividade de β -glicosidase quando o farelo de trigo foi usado como fonte de carbono, enquanto celulose e lactose apresentaram menores atividades quando comparados ao farelo de trigo. Experimentos realizados com *A. niger* mostraram a produção de ao menos quatro isoformas de β -glicosidases em função das fontes de carbono utilizadas, dentre elas estão a lactose e a celulose que induziram duas β -glicosidases tolerantes à glicose (Singhanian *et al.*, 2011).

Em fermentação submersa, o fungo termotolerante *Aspergillus terreus* AN1 teve a produção de β -glicosidase induzida por frutose e celobiose quando

comparado a glicose, além de polissacarídeos e substratos lignocelulósicos (Nazir *et al.*, 2009).

Em geral o BED não apresentou para nenhuma das enzimas estudadas ser uma fonte de carbono indutora, sugerindo que a ausência da lignina no substrato pode desfavorecer a produção de proteínas auxiliares afetando a sinergia das enzimas envolvidas na degradação da biomassa.

5.1.2 Fermentação submersa em tanques agitados

O perfil de produção de FPases, xilanases e β -glicosidases foram avaliados em biorreatores nas respectivas melhores fontes de carbono, selecionadas quando o *M. thermophila* M.7.7. foi cultivado em shaker. Os parâmetros de condução dos processos fermentativos, as máximas atividades e concentração proteica nos biorreatores de 2 L estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Ensaios realizados em tanques agitados com 2 L de capacidade.

Corrida	Substrato / T(°C) /pH	Pulso (h)	FPase (FPU/mL) (h)	Xilanase (IU/mL) (h)	β - glicosidase (IU/mL) (h)	Proteína (mg/mL) (h)
#1	BEX /45 /5	96	0,10 $\pm$ 0,01 (72)	3,88 $\pm$ 0,12 (72)	0,37 $\pm$ 0,04 (120)	0,06 $\pm$ 0,02 (120)
#2	BEX /45 /5	48 / 96	0,13 $\pm$ 0,03 (120)	1,93 $\pm$ 0,13 (96)	0,30 $\pm$ 0,06 (96)	0,08 $\pm$ 0,02 (96)
#3	BEX /45 /6	48 / 96	0,10 $\pm$ 0,02 (96)	1,80 $\pm$ 0,03 (48)	0,48 $\pm$ 0,03 (120)	0,10 $\pm$ 0,04 (96)
#4	BEX /38-29/ 6	96	0,18 $\pm$ 0,03 (120)	2,00 $\pm$ 0,01 (120)	0,44 $\pm$ 0,02 (96)	0,17 $\pm$ 0,01 (120)
#5	BEX + sacarose/45 /6	---	0,21 $\pm$ 0,02 (24)	2,70 $\pm$ 0,07 (48)	0,72 $\pm$ 0,01 (120)	0,16 $\pm$ 0,05 (24)
#6	FT / 45 / 6	---	0,06 $\pm$ 0,01 (24)	2,88 $\pm$ 0,01 (24)	1,64 $\pm$ 0,10 (96)	0,13 $\pm$ 0,01 (24)

Reatores #1 e #2 conduzidos no modo descontínuo alimentado a pH 5.0 e 45 °C diferenciaram-se somente nos períodos do pulso da alimentação, sendo o reator #1 alimentado com 5 g de BEX em 96 h e o reator #2 alimentado em 48 e 96 horas. O reator #3 foi conduzido nas mesmas condições do reator #2, no entanto a pH 6.0. Reator #4 foi igual ao reator #3, no entanto a temperatura inicial foi 38 °C até 96 horas, quando um único pulso de BEX foi adicionado ao sistema. Anterior ao pulso a temperatura foi reduzida para 29 °C e mantida fixa até o final do processo fermentativo. Reatores #5 e #6 foram conduzidos em batelada à 45 °C e pH 6.0 usando, respectivamente, BEX suplementado com sacarose (3:1) e farelo de trigo (FT) como fontes de carbono.

Os biorreatores conduzidos no modo descontínuo alimentado, tiveram as atividades de celulasas reduzidas quando comparados aos resultados obtidos nos experimentos em shaker com BEX como fonte de carbono. Ensaio empregando BEX nas mesmas condições de processo e temperatura, mas a diferentes valores de pH (5.0 e 6.0) também não mostraram significantes diferenças nas atividades de FPases e xilanasas, no entanto um suave aumento na atividade de β -glicosidase foi notado a pH 6.

Sabe-se que proteases de fungos termofílicos exibem atividade ótima entre 40 e 70 °C (Merheb-Dini *et al.*, 2009), então procurando minimizar a influência das enzimas proteolíticas no processo, o cultivo foi iniciado à 38 °C e anteriormente ao pulso de alimentação em 96 h a temperatura foi reduzida para 29 °C, no entanto nenhum ganho em atividade das enzimas avaliadas foi observado.

Apesar de BEX e FOS ter sido a melhor fonte de carbono indutora de xilanase nas fermentações em shaker, BEX suplementado com sacarose foi a fonte selecionada para realização da fermentação em biorreator, onde também não foi observado aumento da atividade de xilanase. A biossíntese de β -glucosidase induzida por farelo de trigo (FT) também foi avaliada em reator que apresentou um pequeno ganho em atividade, além do tempo da atividade máxima ter sido reduzida para 96 horas de fermentação (tabela 2).

Em conclusão, os experimentos em bioreatores demonstraram que as alimentações com BEX em diferentes intervalos de tempo, diferentes valores de pH e de temperatura não apresentaram nenhum ganho particular em atividade enzimática e produção proteica, no entanto, em geral é possível conduzir o *M. thermophila* M.7.7. em fermentação submersa.

5.2 Análise do secretoma do *Myceliophthora thermophila* M.7.7. crescido em diferentes fontes de carbono por espectrometria de massas

Para determinar e caracterizar as proteínas secretadas pelo *M.thermophila* M.7.7., cinco diferentes fontes de carbono e glicose foram fermentados até 36 h e os extratos de proteínas extracelulares foram analisados em detalhe por LC-MS/MS.

Todas as aquisições de espectros foram analisadas sob 5% FDR e considerando pelo menos 2 peptídeos identificados. No total 187 proteínas do *M. thermophila* foram identificadas a partir de 7327 peptídeos únicos caracterizados por espectroscopia de massas. Setenta e duas proteínas foram encontradas em todas as seis condições de crescimento (6115 peptídeos únicos). Oito proteínas foram específicas usando BIN (23 peptídeos únicos) como única fonte de carbono, 5 usando BED (12 peptídeos únicos), 4 proteínas produzidas somente em BEX (12 peptídeos únicos), 6 na mistura de avicel e carboximetilcelulose (CEL) (17 peptídeos únicos), 11 proteínas específicas na mistura de xilana (XIL) (51 peptídeos únicos) e 5 proteínas secretadas somente quando a glicose foi a fonte de carbono (10 peptídeos originais).

80% das enzimas secretadas por *M.thermophila* M.7.7., avaliando as seis diferentes fontes de carbono, correspondem à proteínas depositadas na base de dados CAZy, assim os resultados obtidos indicam que *M. thermophila* tem um amplo sistema hemicelulolítico.

Em geral, as glicosídeo hidrolases, GH55, GH3, GH18, GH31, GH43, GH38 e GH81 foram as enzimas mais abundantes, principalmente quando XIL foi a fonte de carbono, atingindo 63% do total das proteínas identificadas (Figura 7). Xilanases foram identificadas (GH10 e GH11) e secretadas principalmente quando XIL e BIN foram as fontes de carbono. Além disso, glicosidases (GH1, GH17, GH30), galactosidases (GH2), manosidases (GH47, GH92), mananases (GH26), amilases, glicodextranases, glucanases (GH13, GH15, GH16, GH71) e fucosidases (GH95) também foram secretadas. Muitas outras famílias de glicosídeo hidrolases foram identificadas, porém elas correspondem a um menor número de peptídeos únicos (Tabela S1).

O percentual de GHs diminuiu 25% comparando a mistura de xilana comercial com a mistura de celulose comercial (CEL) como meios de cultivo, na qual CEL secretou 38% das enzimas GHs. Os meios BIN, BED e BEX resultaram na secreção

de 47, 49 e 46% de GHs, respectivamente. Por outro lado, 22% de celobiohidrolases, GH6 e GH7 (CBHs), foram secretadas no CEL (37 e 97 peptídeos únicos, respectivamente), 13% em BIN (25 e 90 peptídeos únicos) e 16% das CBHs secretadas em ambos os bagaços pré-tratados (13 e 90 peptídeos únicos para BED e 24 e 100 para o BEX). CBHs apresentaram menor número de peptídeos identificados quando xilana foi a fonte de carbono, correspondendo a apenas 6 % do total das proteínas secretadas. Endoglucanases (GH5, GH12 e GH74) também foram detectadas em baixos níveis, 3% em CEL, BIN, BED e BEX e 2% em XIL como meio (Figura 7). Neste caso os fatores, grau de polimerização, índice de cristalinidade, área superficial, porosidade, barreira de hemicelulose e lignina e a composição da biomassa não podem ser atribuídos à regulação da secreção de endoglucanases, como foi observado para várias outras GHs de *M. thermophila*.

Dois módulos de ligação de celulose família 1 (CBM1) (24 e 12 peptídeos únicos) não foram apenas identificados em glicose e xilana. O módulo de ligação WSC (59 peptídeos únicos) e um segmento de domínio semelhante a CBM1 (38 peptídeos únicos) foram identificados em todas as condições de crescimento. Embora alguns CBM matches tenham sido identificados, eles representaram até 2% considerando todas as fontes de carbono. *M. thermophila* secretou também algumas polissacarídeo liases (PL1, PL3, PL4 e PL20) e carboidrato esterases (CE1, CE3, CE8 e CE16), no entanto ambas as classes de enzimas foram secretadas em níveis baixos (Figura 7). Todos os peptídeos únicos identificados pelo Mascot para a CBM, PL e CE estão na tabela S2.

Recentemente algumas enzimas foram reclassificadas e distribuídas no banco de dados do CAZy dentro da nova classe denominada Atividade Auxiliares (AAs) (Horn *et al.*, 2012; Levasseur *et al.*, 2013). Os resultados proteômicos indicam que a classe AAs atingiu 16% em CEL, 12 e 13% em BIN e BEX, 7 e 6% em BED e XIL (Figura 7). A maioria dos AAs matches correspondem à AA3, glicose-metanol-colina oxidorreductase (GMC). As oxidorreductases GMC são flavoproteínas que contém um domínio de ligação flavina adenina dinucleotídeo (FAD), sendo essa família dividida em quatro subfamílias. A subfamília AA3_1 contém Celobiose Desidrogenases (CDHs), capazes de oxidar a posição anomérica C1 de celobiose ou longas celodextrinas a correspondente cellobiono-1,5- δ -lactonas ou cellobionolactonas, que são espontaneamente ou enzimaticamente hidrolisados para ácidos aldônicos, enquanto FAD é reduzido a FADH₂ (Hallberg *et al.*, 2002). As enzimas pertencentes às subfamílias

AA3_2 e AA3_3 catalisam vários alcoóis aromáticos e alifáticos para aldeídos e H_2O_2 . A quarta subfamília chamada AA3_4, assemelha-se a piranose oxidases e catalisam a oxidação de C2 D-glicopirranose e mono e dissacarídeos estruturalmente análogos aos açúcares correspondentes, reduzindo O_2 e H_2O_2 . Enzimas de todas as quatro subfamílias participam da geração de radicais hidroxil através da reação de Fenton, desta maneira potencializam a oxidação da lignina (Harreither *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2011; Levasseur *et al.*, 2013).

Mascot identificou duas CDHs secretadas em elevadas quantidades em todas as condições de crescimento (222 e 101 peptídeos únicos) e uma terceira enzima da subfamília AA3_1 (19 peptídeos únicos), que foi identificada em glicose com menor número de peptídios únicos. Quatro matches correspondentes à família AA3_2, que se assemelha à aril-álcool oxidases e glicose oxidase, também foram identificados em diferentes bagaços e uma delas foi também regulada em todas as condições de crescimento. Os peptídeos que correspondem a álcool oxidase (AA3_3), a última família AA3 encontrada, foram identificadas apenas em CEL e BIN (2 e 4 peptídeos únicos, respectivamente).

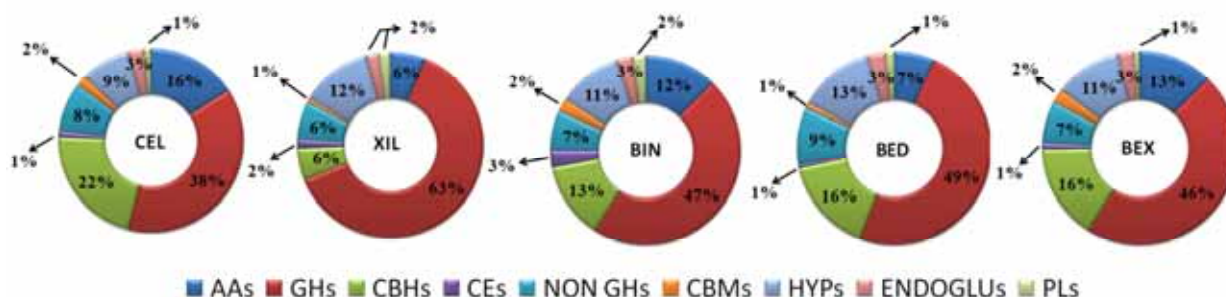


Figura 7. Distribuição e classificação das proteínas encontradas nos secretomas de *M. thermophila* correspondente a nomenclatura do CAZy quando CEL, XIL, BIN, BED e BEX foram usados como meio de cultivo.

Glioxal oxidase (cobre radical oxidase), que pertence à subfamília AA5_1 e oxidam aldeídos simples para os ácidos carboxílicos correspondentes (Whittaker *et al.*, 1996), também foi identificada em todas as diferentes fontes de carbono (85 peptídeos únicos) inclusive em glicose, no entanto com menor número de peptídeos únicos (Tabela S3).

Polissacarídeo monooxigenases (LPMOs) pertencentes à família AA9 também foram secretadas. No entanto apenas sete proteínas foram identificadas com um baixo número relativo de peptídeos únicos em todos os secretomas, embora *M. thermophila* possua 22 LPMOs genes em seu genoma (Levasseur *et al.*, 2013). Apesar do baixo número de peptídeos únicos identificados, notou-se que LPMOs foram mais reguladas quando *M. thermophila* cresceu principalmente em celulose comercial (32 peptídeos originais) e BIN (18 peptídeos originais) sugerindo que o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar modifica a estrutura da celulose e pode desfavorecer a biossíntese de AA9. Recentemente, estudos demonstraram que LPMOs podem atuar sinergicamente na hidrólise da celulose com CDHs por acoplamento da oxidação de celobiose para a ativação redutiva de LPMOs, aumentando a conversão de celulose (Langston *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2011; Dimarogona, Topakas e Christakopoulos, 2013). As análises dos secretomas mostraram alta expressão de CDHs e baixa expressão de LPMOs, mostrando que CDHs podem também usar outros receptores de elétrons além de LPMOs. Portanto, é suposto que as enzimas da família AA9 são altamente específicas e o ciclo oxidoreduutivo ocorre com rapidez suficiente para recuperar a enzima à sua condição redox inicial, considerando-se o mecanismo proposto por Phillips (2011), ou LPMOs permaneceram firmemente ligadas a matriz de lignocelulose durante a extração do secretoma e, portanto foram sub-representadas no microambiente analisado. A tabela S3 mostra os peptídeos únicos correspondentes as sete LPMOs.

As enzimas da família AA1 também foram identificadas principalmente em XIL, BIN e BEX, com 15, 14 e 10 peptídeos únicos, respectivamente. Esta classe possui três subfamílias, lacase (AA1_1), ferroxidase (AA1_2), que catalisam a oxidação de fenóis, aminas aromáticas ou outros substratos ricos em elétrons através da redução de oxigênio para a água (Cañas e Camarero, 2010), e a subfamília AA1_3 chamada de lacase multicopper oxidase. Ferroxidases não foram encontrados no secretoma de *M. thermophila*.

Uma proteína FAD oxidase-like foi identificada no secretoma cultivado em CEL (2 peptídeos únicos), em XIL, BIN (5 e 4 peptídeos únicos em cada estado) e em BEX (3 peptídeos únicos). De acordo com Levasseur (2013), esta enzima é uma de glucooligossacarídeo oxidase classificadas na família AA7. A função enzimática característica destas enzimas é a oxidação dos grupos hidroxil C1 das ligações β -1,4 através de duas reações que caracterizam a oxidação do açúcar de redução à lactona e

hidrólise espontânea ao correspondente ácido, sendo capaz de oxidar mono, di- e celoligossacarídeos com concomitante redução de O_2 para H_2O_2 .

No geral dezessete proteínas com funções preditas foram identificadas, mas apenas quatro delas mostraram um elevado número de peptídeos únicos, sendo uma catalase, uma aldose epimerase, uma piridina nucleotídeo dissulfeto oxirredutase e uma extracelular aldolactonase (Tabela S4).

Catalases são enzimas que desempenham um papel crítico na proteção das células contra os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio, que é constantemente gerado como subproduto do metabolismo aeróbio e através de atividades enzimáticas (Bourdaïs *et al.*, 2012). A análise dos secretomas também identificou enzimas pertencentes às famílias de enzimas geradoras de H_2O_2 (AA3_3, AA7, AA3_2 e AA5_1), que apresentaram baixa expressão na fonte de glicose, sugerindo uma menor função de reduzir o nível de H_2O_2 neste secretoma. No entanto, a catalase foi regulada em todas as fontes de carbono, inclusive em glicose. Aldose epimerase, a enzima responsável pela interconversão anomérica da D-glicose foi claramente identificada e correlacionada com um número significativo de peptídeos únicos mesmo quando a D-glicose foi usada como fonte de carbono. Os resultados confirmam que a aldose epimerase é funcionalmente ativada para o metabolismo da glicose, transformando o sacarídeo na sua melhor configuração anomérica para a assimilação pelo microorganismo. A enzima piridina nucleotídeo dissulfureto oxidorredutase, identificada em todas as condições de crescimento, constituem um grupo importante de enzimas que catalisam a transferência de elétrons entre a NAD(P)(H) e um dissulfureto / ditiol (Miranda-Vizuite e Spyrou, 1997).

A extracelular aldolactonase responsável por catalisar a hidrólise de glucono- δ -lactona e cellobiono- δ -lactona também foi identificada em todas as fontes de carbono com maiores peptídeos únicos em BED (12 peptídeos únicos), BEX e CEL (11 peptídeos únicos em ambos meios). O número de peptídeos identificados foi reduzido em glucose como meio de cultivo, indicando a baixa expressão de lactonas nesse meio. Beeson (2011) investigou os níveis de expressão de duas lactonas extracelulares de *M. thermophila* e também descobriu que estas enzimas são expressas em glicose, porém a produção foi 6 vezes maior quando Avicel foi aplicado como fonte de carbono. As outras treze proteínas não pertencentes ao banco de dados do CAZy foram identificadas independentemente das fontes de carbono utilizadas. A enzima intradiol dioxigenase foi

identificada apenas quando xilana foi usada como meio de crescimento (2 peptídeos originais). A enzima é responsável pela clivagem do anel aromático entre grupos hidroxil sob condições óxicas (Ismail e Gescher, 2012). Os outros matches correspondem a quatro peptidases, uma pertencente ao peptidase M14 carboxipeptidase A/B like, duas foram identificadas como sendo zinco-peptidase e uma peptidase da família S53, a qual foi identificada apenas em celulose como fonte de crescimento (2 original peptídeos). Asparaginase, tirosinase, fosfolipase, fosfatase e uma serino protease também foram identificadas, no entanto com peptídeos únicos relativamente baixos (Tabela S4).

A maioria das proteínas hipotéticas identificadas mostraram baixos peptídeos únicos, no entanto algumas proteínas mostraram ser importantes na via de biodegradação (Tabela S5). As proteínas hipotéticas gi 347011745 e 347011921 foram identificadas em todas as condições de crescimento, incluindo a glicose. As outras proteínas hipotéticas foram reguladas de acordo com a complexidade da fonte de carbono, por exemplo, a proteína hipotética 307007100 foi identificada com 28 peptídeos únicos apenas quando xilana foi a fonte de carbono aplicada.

Apesar da grande quantidade de enzimas identificadas, tabelas foram feitas classificando as top 30 enzimas mais produzidas pelo *M. thermophila* M.7.7. comparando as diferentes fontes de carbono, a partir da normalização contra a contagem espectral de cada amostra subtraída da contagem espectral da fonte carbono controle glicose, assim o valor quantitativo de um dado componente proteico de um secretoma refletiu a quantidade de proteína sintetizada como uma resposta direta da fonte de carbono aplicada.

As enzimas mais expressas em BIN, BEX, BED e CEL foram as CDHs (AA3_1) e as glicosídeo hidrolase família 7 (CBH), no entanto em XIL como fonte de carbono a maioria das enzimas identificadas pertencem a classe das glicosídeo hidrolases. A classificação das top 30 enzimas identificadas pela espectrometria de massas para todos os seis secretomas se encontra na tabela S6, bem como uma discussão mais detalhada na seção Lista de Manuscritos - Manuscrito I, item 3.4.

5.3 Purificação da β -glicosidase produzida pelo *M. thermophila* M.7.7.

O extrato enzimático bruto para a purificação foi obtido do cultivo de FT durante 4 dias, e foi concentrado empregando pressurizador com corte de 10 kDa. Nesta

etapa o tampão foi trocado para Tris-HCl 50 mM pH 8.0 e a amostra foi também desalinizada por diálise no mesmo tampão. A amostra bruta previamente preparada, foi submetida a cromatografia de troca iônica em resina Resource Q, sendo fracionada em 9 picos com passos de 5% de NaCl até 35% do sal, onde as frações R1 e R2 (Figura 8A) que continham a atividade enzimática de β -glucosidase foram reunidas e preparadas para o próximo passo cromatográfico. A troca iônica apresentou rendimento final de 25,37% e fator de purificação de 5 vezes (tabela 3).

O segundo passo de purificação constou de uma cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.0 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M. A eluição foi realizada em dois passos, obtendo-se uma primeira fração a 50% do sal (H1) e uma segunda (H2) a 100% ou contendo somente o tampão Tris-HCl (Figura 8B). Ambas frações apresentaram atividade de β -glicosidase, no entanto a fração H1 mostrou ser mais ativa no teste de atividade.

Todas as etapas cromatográficas foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, assim após a HIC foi verificado somente uma banda de impureza na fração H1 e com massa molecular muito inferior a da enzima alvo, desta maneira a cromatografia de exclusão molecular foi empregada em Sephadex G-75 (Figura 8C) com o mesmo tampão citado, obtendo-se a banda de β -glucosidase pura que foi visualizada no gel de agarose (Figura 9). Os rendimentos e fator de purificação dos passos de purificação estão na tabela 3.

Tabela 3. Recuperação da β -glicosidase durante as etapas de separação.

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação (fold)	%Rendimento
Crude filtrate	83,60	1000,00	11,96	1,00	100,00
Concentration	5,16	188,80	36,59	3,06	18,88
Resorce Q	4,24	253,70	59,83	5,00	25,37
HIC	0,22	27,59	125,96	10,53	2,76
G-75	0,18	18,88	104,89	8,77	1,89

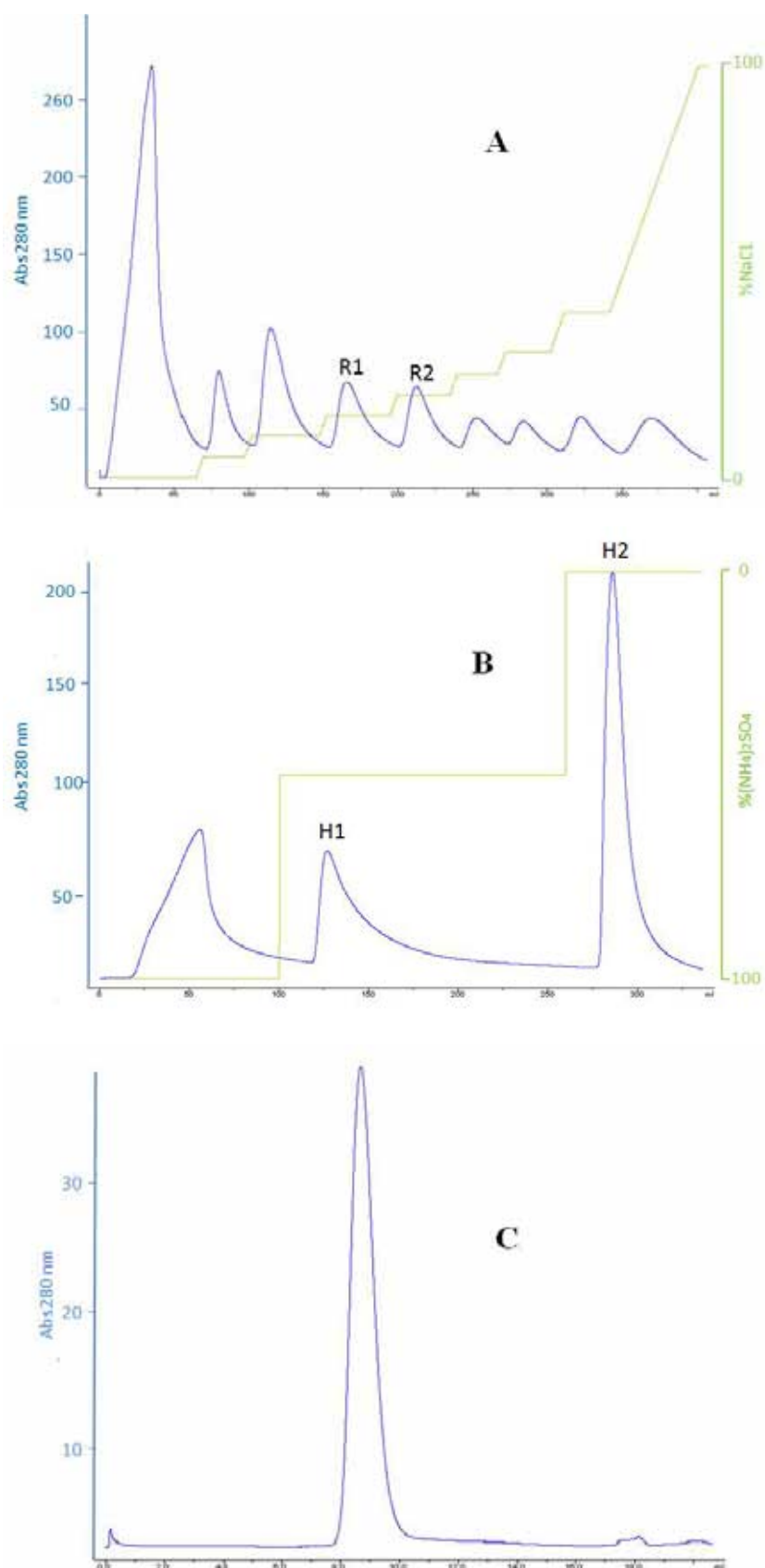


Figura 8. Perfil de eluição de β -glicosidase na cromatografia em resina de troca iônica (A), em resina hidrofóbica (B) e em exclusão molecular (C).

PAGE eletrofore sem SDS e gel de esculina com cloreto férrico foram realizados em todos os passos dos experimentos para a avaliação da pureza nas etapas de purificação da enzima alvo (figura 9).

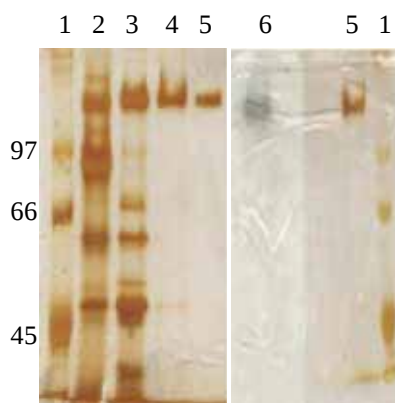


Figura 9. Passos de purificação da β -glucosidase por PAGE não desnaturante corada com nitrato de prata. 1-marcador molecular, 2-extrato cru, 3-troca iônica, 4-interação hidrofóbica, 5-exclusão molecular e 6-zimograma para β -glicosidase. Os detalhes estão descritos na seção de material e métodos.

O método de purificação de β -glicosidase de *M. thermophila* M.7.7. não apresentou rendimento muito expressivo e elevado fator de purificação, no entanto sua atividade específica de aproximadamente 105 U/mg indica um alto grau de pureza imprescindível para a caracterização bioquímica e a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima. A enzima pura foi identificada como MTbgl3b.

5.4 Caracterização bioquímica e determinação dos parâmetros cinéticos da β -glicosidase de *Myceliophthora thermophila* M.7.7.

5.4.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da β -glucosidase pura e das β -glucosidases presentes no extrato bruto.

O efeito da temperatura foi primeiramente determinado em pH fixo no valor de 5, somente depois da obtenção da curva de temperatura ótima realizou-se a análise do efeito do pH. A faixa de temperatura testada foi de 30 a 80 °C, a de pH entre 2

e 10 e as atividades foram medidas pelo método padrão usando pNP- β -D-glucopiranoside.

A atividade da β -glucosidase pura (MTbgl3b) aumentou progressivamente alcançando atividade máxima à 60 °C, o extrato bruto apresentou perfil similar a enzima pura, no entanto a atividade máxima foi deslocada para 65 °C. Ambas as amostras (MTbgl3b e extrato bruto) tiveram suas atividades bruscamente diminuídas após temperaturas acima de 70 °C, alcançando atividade residual menor do que 23% à 80 °C em ambas amostras (Figura 10A).

O pH ótimo para ambas amostras foi 4,5, no entanto o extrato bruto alcançou um platô a valores de pH variando entre 4,5 e 5,0, enquanto que a β -glucosidase purificada mostrou gradual diminuição da atividade já em pH maiores do que 4,5 (Figura 10B), indicando que a enzima em estudo é uma β -glicosidase ácida.

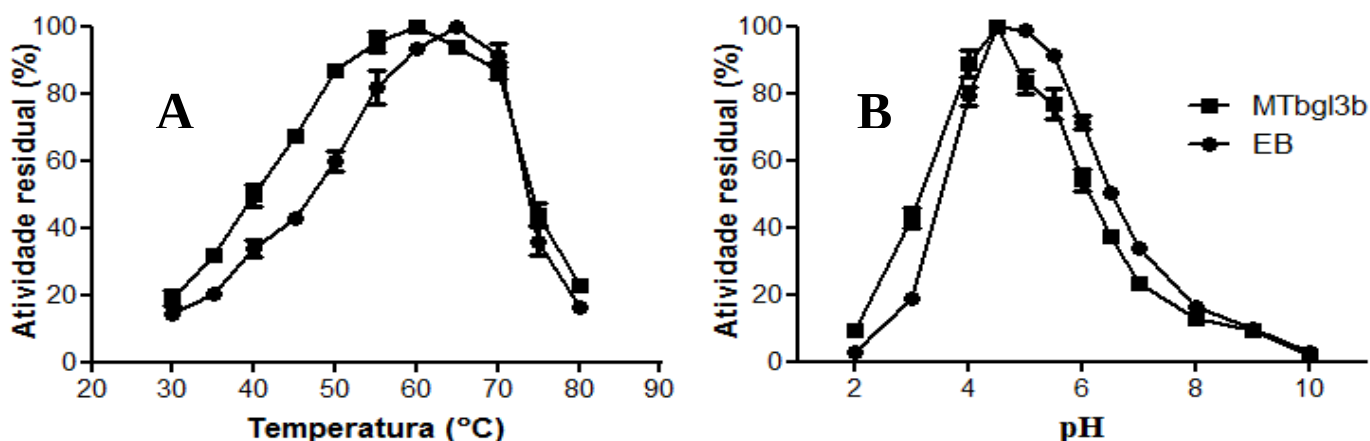


Figura 10. Temperatura ótima (A) e pH (B) do extrato bruto (EB) e da MTbgl3b de *M. thermophila* M.7.7.

Roy (1991) purificou uma β -glicosidase de *M. thermophila* e descreveu pH e temperatura ótima de 4,8 e 60 °C, respectivamente (Roy *et al.*, 1991).

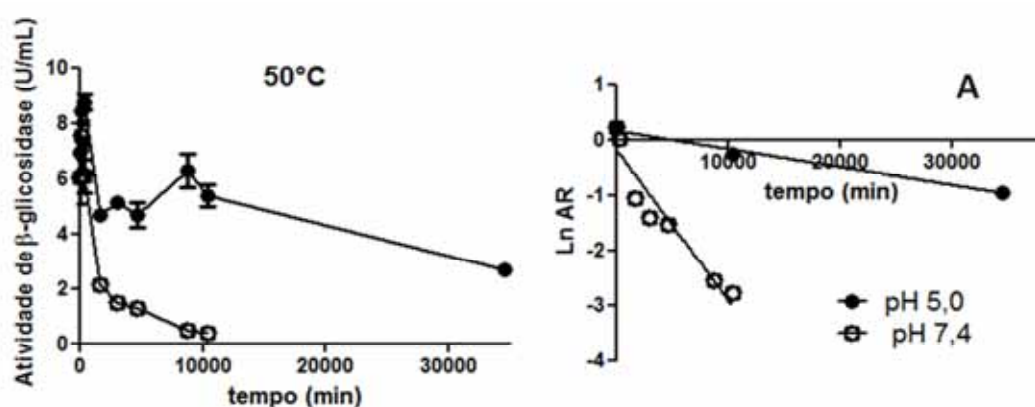
5.4.2 Desnaturação térmica da MTbgl3b

Apesar da MTbgl3b ter mostrado progressiva inativação à temperaturas acima de 70 °C, os testes de estabilidade em função do tempo foram realizados nas temperaturas de 80, 70, 60 e 50 °C para os valores de pH 5,0 e 7,4.

Em 80 °C MTbgl3b foi incubada por 30 minutos apresentando baixos tempos de meia-vida ($t_{1/2}$), sendo em pH 5,0 e em 7,4, 2,32 e 1,41 min, respectivamente. A 70 °C a incubação foi realizada por 3 horas e os tempos de meia vida foram 28,88 min e 1,69 min nos respectivos pHs 5,0 e 7,4. Desta maneira reduzindo-se a temperatura de incubação a enzima pode ser incubada por tempos mais longos e os valores dos tempos de meia vida para a MTbgl3b passaram a ser maiores.

A meia vida em pH 5,0 à 60 °C foi de 7,22 horas, já à 50 °C foi de 16 dias, enquanto que em pH 7,4 os $t_{1/2}$ foram 2,96 e 3,85 horas à 60 e 50 °C, respectivamente. A figura 11A a 11C mostram as atividades da MTbgl3b em função do tempo de incubação nas temperaturas de 50 a 70 °C e as linearizações para o cálculo dos tempos de meia-vida.

Em conclusão, MTbgl3b apresentou maior estabilidade em pH 5,0 e à 50 °C, estando o valor de pH 7,4 na temperatura de 50 °C favorecendo a inativação da enzima. Desta maneira o binômio pH e temperatura (5 e 50 °C), é crucial para a eficiente aplicação da enzima na catálise, mantendo a efetiva conformação da biomolécula, conferindo a sua estabilidade, afinidade ao substrato e a formação de certas ligações e mobilidades que relacionam a estrutura à sua função biológica. A figura 12 mostra a estabilidade quando o $t_{1/2}$ e a temperatura são plotados nos diferentes valores de pH ensaiados.



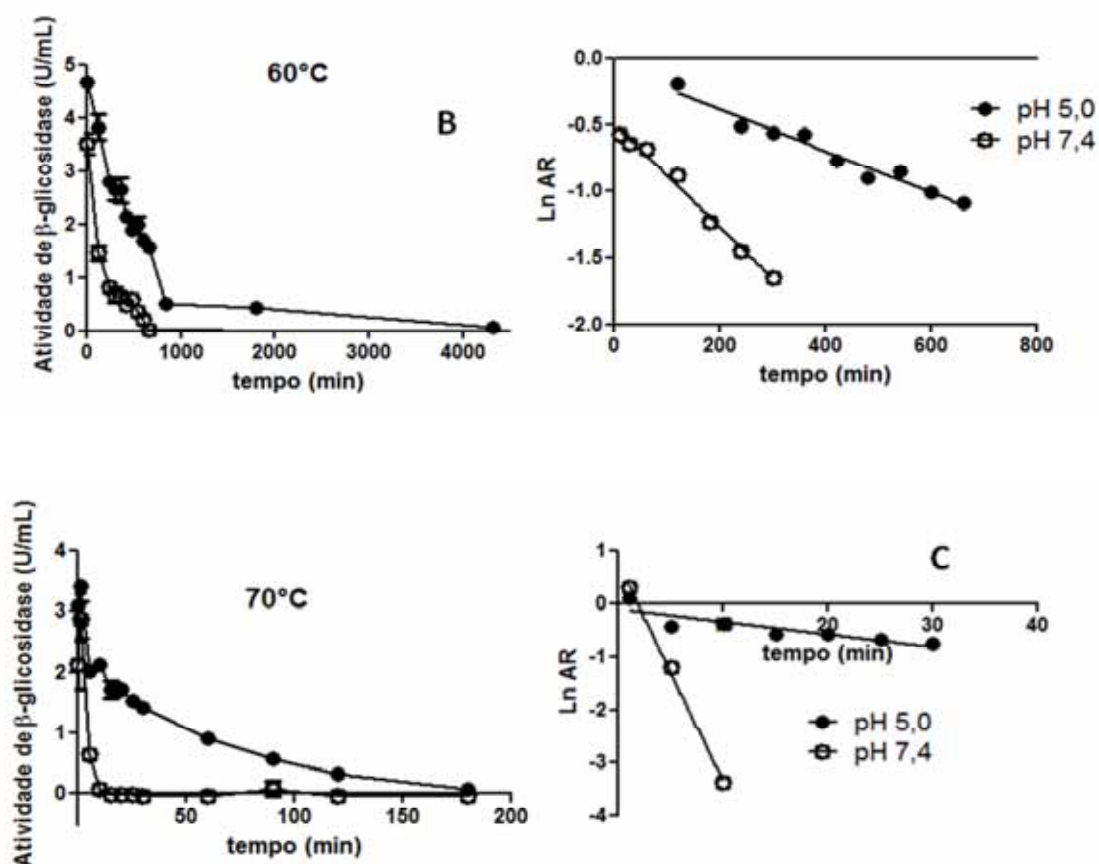


Figura 11. Atividade da MTbg13b e regressão linear do plot de Ln das atividades residuais (AR) em função do tempo de incubação em 50 °C (A), 60 °C (B) e 70 °C (C).

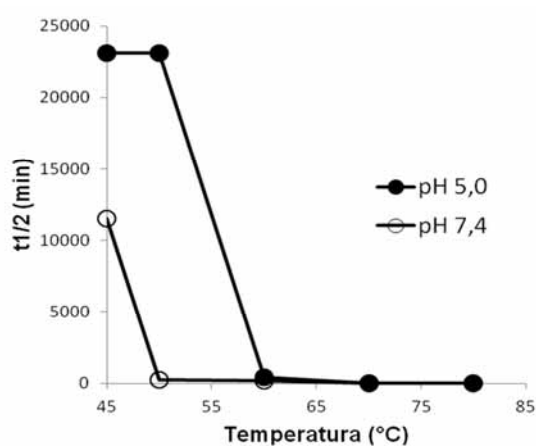


Figura 12. Tempos de meia vida em função da temperatura de incubação para a MTbg13b nos valores de pH de 5,0 e 7,4.

De acordo com a equação de Arrhenius o coeficiente da velocidade de termoinativação (K_d) é obtido através da inclinação da regressão linear da figura 11. Os coeficientes de correlação (R^2) das retas obtidas mostraram valores maiores do que 0,95 estando desta maneira, a termoinativação da β -glucosidase ajustada à reação biocinética de primeira ordem, assim o tempo de incubação e as temperaturas utilizadas foram suficientes para a análise da estabilidade e da inativação da enzima.

Para o cálculo das Energias de ativação da desnaturação (E_{ad}), o logaritmo neperiano dos K_{ds} obtidos foram plotados em função das respectivas temperaturas recíprocas, sendo as energias para a desnaturação da β -glucosidase determinadas nos valores de pH 5,0 e 7,4 da ordem de 288,35 e 232,53 kJ/mol respectivamente, que são os valores de energia necessária para a mudança da conformação da enzima (Figura 13) (Cobos e Estrada, 2003).

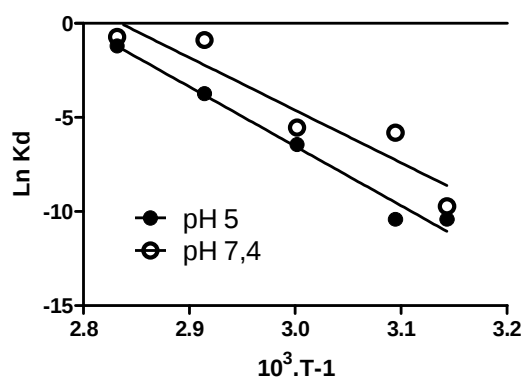


Figura 13. Cálculo da energia de ativação da desnaturação empregando a técnica da linearização da equação de Arrhenius.

5.4.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos da MTbgl3b

Os parâmetros cinéticos foram calculados empregando tanto o substrato sintético, p- β -NP-glucopiranosídeo (p- β -NPG), como a celobiose como substrato natural, sendo também avaliados tanto a enzima MTbgl3b pura como o extrato bruto total, em ambos substratos acima citados. No entanto, o estudo de inibição por D-glicose foi realizado somente em p- β -NPG. Todos os ensaios foram realizados nas condições ótimas previamente estimadas para a MTbgl3b.

Os valores de K_m e V_{max} foram estimados usando o programa GraphPad Prism versão 5.0, na qual a β -glucosidase de *M. thermophila* M.7.7. seguiu a cinética de Michaelis-Menten (MM). Lineweaver-Burk e Dixon plot foram usados para determinar se Michaelis-Menten poderia ser aplicado. Os valores dos parâmetros cinéticos estão apresentados na tabela 4.

Os resultados de K_m indicam que MTbgl3b e as β -glucosidases presentes no extrato bruto apresentaram maior afinidade para p- β -NPG (0.46 ± 0.07 mM) e celobiose (0.52 ± 0.08 mM), respectivamente. Por outro lado, a máxima atividade específica (V_{max}) para MTbgl3b em celobiose foi duas vezes maior do que a V_{max} das β -glucosidases do extrato bruto em celobiose e também MTbgl3b no substrato artificial (p- β -NPG). Desta forma, apesar da MTbgl3b ter mostrado maior afinidade sobre p- β -NPG, a enzima é mais rápida e mais eficiente sobre a celobiose.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos da β -glucosidase de *M. thermophila* M.7.7.

Substrato Parâmetro	p- β -NPG	Celobiose	
		MTbgl3b	Extrato bruto
$V_{max}(\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1})$	$60,85 \pm 0,05$	$120,33 \pm 0,09$	$54,37 \pm 0,05$
K_m (mM)	$0,46 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,10$	$0,52 \pm 0,08$
K_i (mM)	$4,26 \pm 0,71$	-	-
K_{cat} (s^{-1})	96,34	190,53	86,08
K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	209,12	222,22	165,10

Uma grande faixa de valores de K_m para p- β -NPG e celobiose tem sido relatados para inúmeras β -glucosidases produzidas por diferentes fungos, além da investigação do efeito de diferentes açúcares nessas enzimas (Karnaouri *et al.*, 2013).

Neste trabalho, avaliou-se a inibição da MTbgl3b por D-glicose (0-40 mM) empregando p- β -NPG como substrato. Os resultados mostraram que a enzima foi competitivamente inibida pelo açúcar com valor de K_i baixo ($4,26 \pm 0.71$), indicando alta inibição por glicose quando p- β -NPG é o substrato (Figura 14A). Inibição pelo p- β -NPG também foi observada quando a cinética de MM foi realizada na ausência de inibidor, notando-se que a cinética segue o perfil Michaeliano até a concentração de 1 mM do substrato artificial, reduzindo a taxa inicial ($\mu\text{mol/min/mL}$) em 40% quando a concentração do substrato foi de 6 mM, fato não observado tanto para a MTbgl3b quanto

para o extrato bruto quando celobiose foi hidrolisada na ausência de inibidor (Figura 14B).

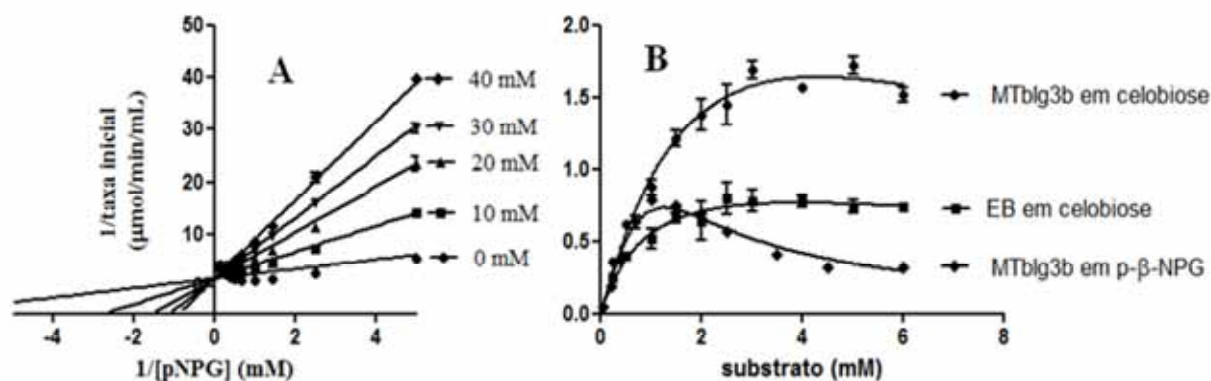


Figura 14. Lineweaver-burk plot da MTbgl3b em p-β-NPG inibida por D-glicose variando de 0 até 40 mM (A). Taxas iniciais da hidrólise de p-β-NPG e cellobiose aplicando o extrato bruto e a MTbgl3b de *M. thermophila* M.7.7. (B).

Apesar da baixa constante de inibição por glicose, considerando p-β-NPG como substrato, as β-glicosidases de *T. reesei* e *A. nidulans*, os fungos mais conhecidos e empregados nos preparados dos coquetéis enzimáticos, apresentaram menor eficiência catalítica e foram mais inibidas por glicose (Chauve *et al.*, 2010) do que a β-glicosidade MTbgl3b de *M. thermophila* M.7.7.

5.4.4 Susceptibilidade da MTbgl3b a sais e agentes caotrópicos

Os efeitos de uma variedade de íons e agentes químicos foram avaliados sobre a β-glicosidase purificada. A atividade da enzima foi fracamente reduzida na presença de cloreto de sódio e de bário, mantendo 86,6 e 86,2% da atividade residual. Sulfato de cobre, cloreto de magnésio e sulfato de ferro e zinco inibiram a MTbgl3b restando 24,0%, 19,5%, 6,9% e 4,0% das atividades, respectivamente. Por outro lado cloreto de cobalto, cálcio, potássio e sulfato de manganês não alteraram significativamente a atividade residual que se manteve acima de 94% (Figura 15).

Azida sódica (0,2%), muita usada como conservantes nos coquetéis enzimáticos, reduziu a atividade da β-glicosidase em 15,18% sendo, no caso de extratos de *M. thermophila*, recomendado o uso do sal em concentração mais diluída do que 0,2% (p/v).

Na presença de SDS e EDTA MTbgl3b foi muito pouco inativada seguida pelo mercaptoethanol (β ME) com 93,4% de atividade residual. Os surfactantes triton X-100 e tween 80 não influenciaram a atividade da MTbgl3b. Desta maneira concluí-se que a enzima pode não depender de íons metálicos como cofator para sua atividade, além da sua estrutura tridimensional não ter sido alterada por SDS e β ME a 0,5% (v/v) e 5 mM, respectivamente (Figura 16).

Os resultados obtidos apresentam similaridades com trabalhos anteriores. β -glicosidase III de *A. terreus* (Nazir *et al.*, 2009), β -glicosidase do *P. italicum* (Park *et al.*, 2012) e do *Melanocarpus* sp MTCC 3922 (Kaur *et al.*, 2007) também relataram independência de cofatores e ampla tolerância na presença de íons quando p- β -NPG foi empregado como substrato. As figuras 15 e 16 mostram as atividades residuais na presença de íons e solventes.

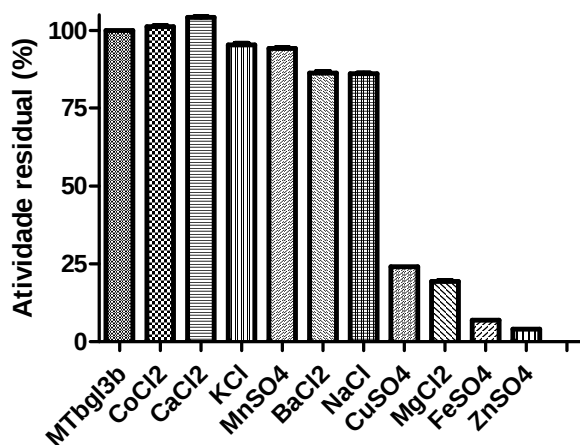


Figura 15. Efeito de íons sobre a atividade enzimática da MTbgl3b.

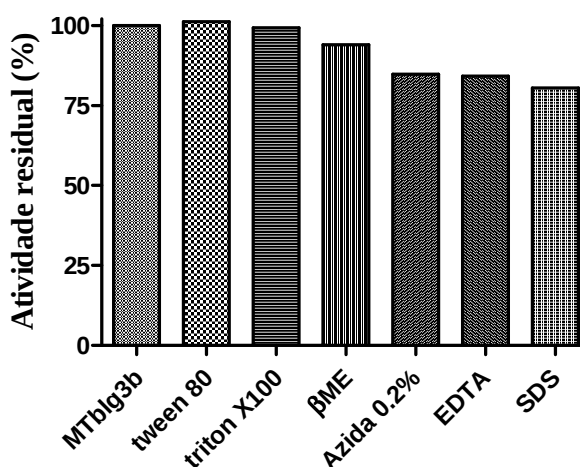


Figura 16. Efeito de solventes sobre a atividade enzimática da MTbgl3b.

A influência de etanol e metanol na atividade hidrolítica também foi avaliada e ambos os alcoóis reduziram a atividade enzimática mesmo na concentração de 5% (Figura 17). Os resultados também mostraram que o tamanho da cadeia do solvente promove inibição ou inativação da conformação da enzima, desde que menor atividade residual foi medida nas hidrólises de p- β -NPG quando etanol estava presente na reação enzimática (Figura 17). β -glucosidase de *Melanocarpus* sp MTCC 3932 e *Thermoascus aurantiacus* tiveram suas atividades enzimáticas positivamente influenciadas quando metanol e etanol foram adicionados a reação, β -glicosidase II e III (β GII and β GIII) de *Aspergillus terreus* foram inibidas em etanol e metanol 20%, no entanto uma terceira isoforma (β GI) foi positivamente influenciada na presença dos alcoóis (Parry *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2007; Nazir *et al.*, 2009). Alguns trabalhos interpretam o aumento da atividade enzimática na presença de alcoóis como uma influência positiva na atividade hidrolítica, no entanto este comportamento pode também ser explicado pelo aumento da taxa de transglicosilação, no qual p- β -NPG é usado como o doador de prótons e metanol/etanol como o aceptor nucleofílico, aumentando assim a concentração de p-Nitrophenol (p-NP) proveniente dos mecanismos de hidrólise e de transglicosilação, desde que ambas as reações podem ocorrer simultaneamente (Bohlin *et al.*, 2013).

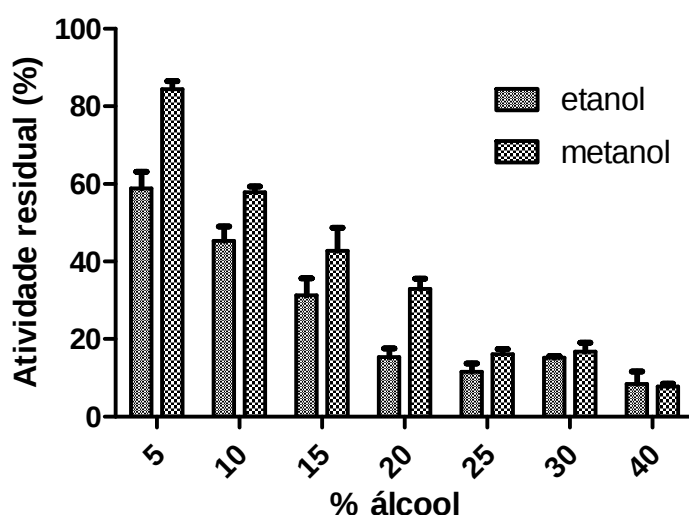


Figura 17. Efeito de diferente % (v/v) de metanol e etanol na atividade enzimática de MTbgl3b.

5.4.5 Especificidade da MTbgl3b a diferentes substratos

A especificidade da MTbgl3b foi determinada em uma série de diferentes aril-glicosídeos e sacarídeos. A enzima foi mais específica em celobiose (53,0 U/mg) e p- β -NPG (40,2 U/mg), menores atividades específicas foram observadas em laminarina (12,7 U/mg), lichenana (5,0 U/mg), β -glucano (3,5 U/mg) e p- β -NP-cellobiosídeo (2,3 U/mg) (Figura 18). Nenhuma atividade foi detectada para 4-p- β -NP-galactopiranosídeo, -xilósídeo, -manopiranosídeo, -fucopiranosídeo, 4-p- α -NP-L-arabinofuranosidase, Avicel (AV), carboximetilcelulose (CMC), Sigma cell, pectina, xiloglucano, beech and birch wood xilana, arabinogalactana, galactomanana e lactose.

Desta maneira a MTbgl3b demonstrou elevada especificidade para sacarídeos com menor grau de polimerização, além de atuar especificamente em ligações β -1,4 (celobiose e p- β -NPG), D-glicose β -1,3 e β -1,6 (laminarina), D-glicose β -1,4-and β -1,3 (lichenana), e D-glicose β -1,3, β -1,4 e β -1,6 (β -glucan), sendo então classificada, de acordo com Bhatia e colaboradores (2002), no grupo de enzimas com ampla especificidade por atuar em diferentes tipos de substratos.

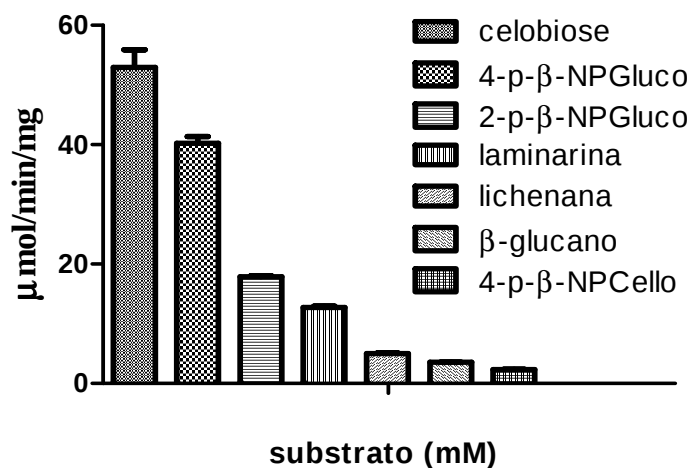


Figura 18. Efeito de aril-glicosídeos e sacarídeos na atividade específica de MTbgl3b.

5.5 Hidrólise enzimática empregando o coquetel enzimático bruto do *Myceliophthora thermophila* M.7.7. produzido em bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

O extrato bruto produzido a partir da fermentação de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi selecionado por apresentar grande diversidade de enzimas contidas no banco de dados CAZy, além disso a biomassa fermentada não passou por pré-

tratamento químico, podendo desta maneira fornecer um novo modelo do sistema natural de biodegradação pelo *M. thermophila* M.7.7.

Os experimentos de hidrólise da biomassa foram realizados em quatro diferentes substratos, EC, BIN, BEX e BED e a carga de enzima foi de 0,05 mg de proteína por grama de glucano (ensaios foram realizados anteriormente para avaliar a saturação da carga de enzima). Para detectar mono-, dissacarídeos e os ácidos liberados, a técnica de HPLC-RI foi usada, medindo-se glicose, celobiose, xilose, arabinose e os ácidos acético, fórmico e levulínico.

Os resultados mostraram que mesmo usando baixa quantidade de proteínas, todos os substratos foram acessados pelas enzimas do extrato bruto, liberando sacarídeos solúveis que foram convertidos à glicose. Com a técnica HPLC-RI foi possível somente identificar a concentração de sacarídeos e alguns ácidos, no entanto sabendo que o sistema enzimático oxidativo estava presente no extrato bruto, os resultados obtidos representam a co-eluição de glicose e ácido glucônico (Glc+GlcA) e de celobiose e ácido celobiônico (GlcGlc+GlcGlcA). Desta maneira as concentrações de glicose e a celobiose foram superestimadas devido aos ácidos aldônicos (açúcares oxidados) produzidos pelo sistema enzimático oxidativo do *M. thermophila* (Cannella *et al.*, 2012).

Apesar da co-eluição, EC apresentou a mais alta concentração Glc+GlcA, seguida por BIN, BED e BEX, respectivamente (Figura 19A). Apesar da redução no índice de cristalinidade e do grau de polimerização devido ao pré-tratamento mecânico (Alvira *et al.*, 2010), BIN também foi degradado pelo extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7. De acordo com Alvira (2010), o pré-tratamento mecânico aumenta a superfície específica e reduz o tamanho da partícula, que neste caso pode ter favorecido a acessibilidade do ataque enzimático aos polímeros de glucano e xilana. O pré-tratamento empregado para a obtenção de BED também conduziu a um aumento na área superficial e na diminuição do grau de polimerização e cristalinidade (Martin *et al.*, 2012). Desta maneira os resultados da hidrólise mostraram que a concentração de Glc+GlcA foi maior em BIN e BED do que em BEX, indicando que o tratamento por explosão a vapor parece não ser suficiente para aumentar o ganho na hidrólise enzimática (Figura 19A).

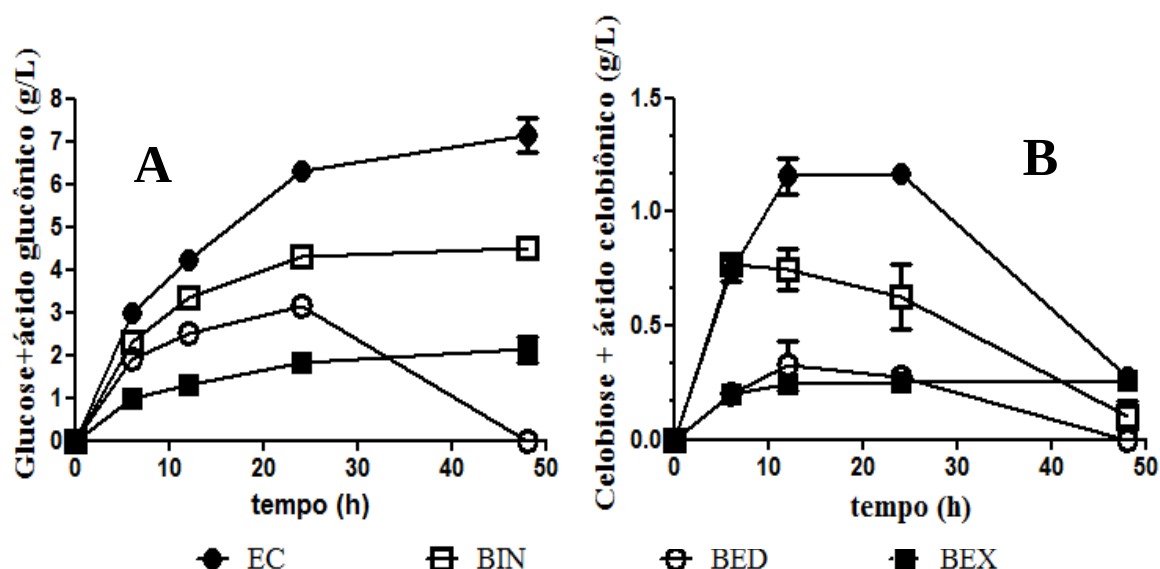


Figura 19. Concentração (g/L) de glicose mais ácido glucônico (A) e celobiose mais ácido celobiônico (B) medido após hidrólise enzimática a 5% (p/v) de celufloc (EC), bagaçço *in natura* (BIN) e bagaçços pré-tratados (BED e BEX) a 50 °C, usando como coquetel enzimático o extrato bruto do *M. thermophila* M.7.7. produzido em BIN como fonte de carbono.

Um substancial número de estudos mostraram a importância da cristalinidade e do grau de polimerização nas taxas de hidrólise, considerando o tipo de pré-tratamento, a dosagem, a eficiência e o sinergismo entre as enzimas. Experimentos demonstraram a natureza processiva de enzimas individuais e suas misturas sobre o papel de filtro, Avicel, celulose microcristalina bacteriana (BMCC), algodão e celulose tratada com ácido fosfórico (Hoshino *et al.*, 1997; Våljamäe *et al.*, 1999; Jeoh, Wilson e Walker, 2006; Jeoh *et al.*, 2007). Entretanto os autores elucidaram o mecanismo sinérgico apenas carregando CBHs e endoglucanases sobre os diferentes substratos cristalinos, resultando na diminuição do efeito sinérgico. Em contraste Langston (2011) analisou o sistema enzimático oxidorreduutivo da despolimerização da celulose aplicando classes nativas e recombinantes de CDHs e AA9 suplementados com CBHs e endoglucanases, resultando no aumento da conversão da celulose microcristalina, do Avicel e inclusive do BMCC (Langston *et al.*, 2011). Dois estudos de AA9 de *Thermoascus aurantiacus* e *Neurospora crassa* mostraram a habilidade da AA9 no aumento da atividade de celulases na presença de CDH (Kostylev e Wilson, 2012). Assim, parece que o efeito sinérgico observado pelo sistema enzimático do *M. thermophila* M.7.7. não depende somente das diferenças químicas apresentadas pelas variedades de pré-tratamentos na biomassa, mas também é dependente da microcristalinidade e da área superficial disponível de cada biomassa.

Na hidrólise de EC a concentração de GlcGlc+GlcGlcA foi maior e permaneceu constante entre 12 e 24 horas (Figura 19B), provavelmente devido a alta quantidade de ácido celobiônico gerada pela ação das CDHs e celobiose gerada pelo complexo de celulases. Apoiando a especificidade da CDH por estruturas cristalinas da biomassa vegetal, o BIN também foi convertido quando o extrato bruto foi aplicado, entretanto nenhum acúmulo de GlcGlc+GlcGlcA foi observado, sugerindo que a conversão do bagaço *in natura* à glicose não foi afetada pela inibição da β -glicosidase (Dale *et al.*, 1985; Parry *et al.*, 2001). Além disso, uma menor ação das CDHs pode ter ocorrido devido a menor acessibilidade das enzimas ao BIN, resultando em uma menor concentração de celobionolactona, podendo esta também ter sido lentamente convertida, via reação enzimática com β -glicosidase, a glicose e ácido glucônico (Cannella *et al.*, 2012).

CDHs foram as enzimas mais secretadas quando BIN foi a fonte de carbono, apresentando a partir dos resultados, ser uma das mais importantes enzimas auxiliares necessárias na conversão da biomassa lignocelulósica para o *M. thermophila*, por romper primeiramente as regiões microcristalinas da celulose, liberando cadeias de oligossacarídeos, permitindo a melhor ação das CBHs e também abrindo a estrutura do substrato para que endoglucanases possam alcançar e atuar sobre as regiões amorfas do polímero. Além das CDHs, duas diferentes GH7 também foram identificadas no secretoma, sugerindo a ocorrência do modo sinérgico de ação no processo enzimático de hidrólise, predito por Reese em 1950 (Elwyn, Siu e Levinson, 1950).

Ambos pré-tratamentos, explosão a vapor e o tratamento combinado de explosão a vapor mais a deslignificação alcalina, não mostraram efeitos melhorando a acessibilidade e digestibilidade da celulose. Assim, se supõe que o extrato bruto possui o sistema enzimático eficiente e sinérgico para a biodegradação, desde que a celulose comercial e o bagaço *in natura* triturado apresentaram os melhores resultados.

Ácido acético, xilose e arabinose também foram detectados nos hidrolisados. A produção e as quantidades detectadas apresentaram ser dependentes do substrato empregado. Por exemplo, o ácido acético foi detectado somente quando BIN foi hidrolisado, sendo que grupos acetil são encontrados na hemicelulose do bagaço *in natura* (Alvira *et al.*, 2010). Os hidrolisados de BIN e EC mostraram as mais altas concentrações de xilose. Análises prévias da composição química de BIN e EC detectaram que os substratos contém cerca de 25,2% (Rocha *et al.*, 2012) e 15% de

hemicelulose (Ribeiro *et al.*, 2012), respectivamente. Já BED e BEX que resultaram em hidrolisados com menor concentração de xilose, mostraram conteúdo de hemicelulose em cerca de 6,5% (Rocha *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2012). Arabinose foi detectada somente em EC e BIN (Figura 20). Os ácidos fórmico e levulínico não foram detectados.

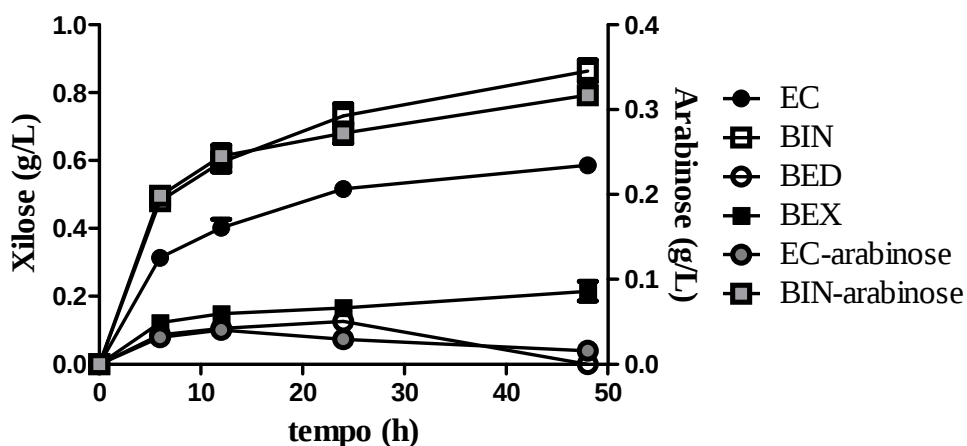


Figura 20. Concentrações (g/L) de xilose e arabinose medidas após hidrólise enzimática a 5% (p/v) de celufloc (EC), bagaço *in natura* (BIN) e bagaços pré-tratados (BED e BEX) a 50 °C, usando como coquetel enzimático o extrato bruto do *M. thermophila* produzido em BIN como fonte de carbono.

Contudo o bagaço *in natura* apresentou maior conversão da celulose, alcançando 21%, seguido da celulose comercial a 16% em 24 horas de hidrólise com carga enzimática de apenas 0,05 mg de proteína total/grama de glucano (Figura 21).

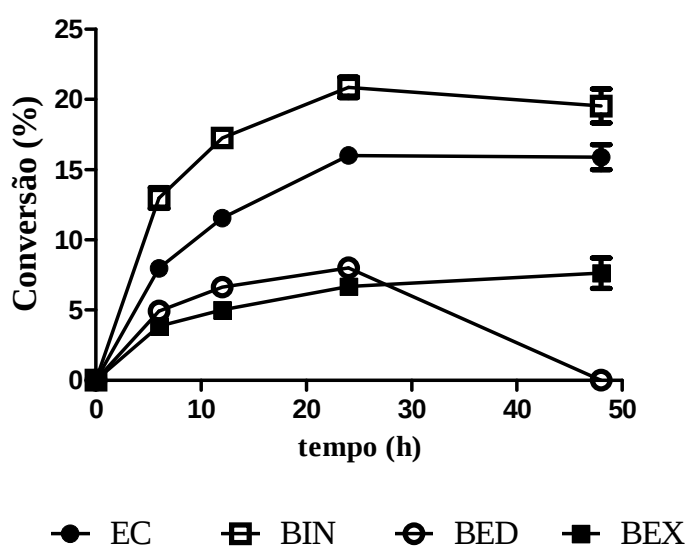


Figura 21. Conversão da celulose nas hidrólises de celufloc (EC), bagaço *in natura* (BIN) e bagaços pré-tratados (BED e BEX).

6. Conclusões

Diferentes fontes de carbono influenciaram o perfil de produção de FPases, xilanases e β -glicosidases quando *M. thermophila* M.7.7. foi cultivado sob agitação constante em shaker, sendo a xilanase a enzima que apresentou maior atividade em todas as fontes estudadas.

Os diferentes períodos dos pulsos de alimentação com BEX e a variação na temperatura nos biorreatores de 2 L não favoreceram aumento das atividades enzimáticas. Os valores de FPase obtidos nos ensaios dos biorreatores foram tão baixos quanto as atividade do cultivo em shaker.

A análise dos diferentes secretomas por *fingerprinting* identificou 187 proteínas de *M. thermophila* M.7.7., onde foram observadas relevantes diferenças na expressão e secreção das enzimas em função das características químicas e estruturais dos polímeros naturais e comerciais empregados como substrato na fermentação submersa.

Um extenso repertório enzimático do sistema oxidativo lignocelulítico foi identificado pela espectroscopia de massas, incluindo máxima expressão de CDHs com os bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e explodido e deslignificado como substrato, sendo portanto necessária a caracterização do coquetel enzimático de *M. thermophila* empregando técnicas redox, além dos métodos clássicos de dosagem de atividade enzimática.

A MTbgl3b mostrou alta estabilidade em pH 5,0 e à 50 °C, que são os valores dos parâmetros usuais empregados na hidrólise do lignocelulósico, além do tempo de meia vida de 16 dias nessas condições.

Apesar da baixa constante de inibição por glicose, a MTbgl3b apresentou maior eficiência catalítica e foi um pouco menos inibida do que as β -glicosidases de *T.reesei* e *A. nidulans*, que são os fungos mais conhecidos e empregados nos preparados de coquetéis enzimáticos.

Hidrólises enzimáticas realizadas com o extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7. com baixa carga de proteína, apresentaram maior conversão nos substratos bagaço *in natura* e em celulose comercial, do que nos bagaços pré-tratados a vapor (BEX) e pela combinação vapor mais solução alcalina (BED), indicando que os pré-tratamentos inviabilizam as interações sinérgicas na hidrólise da celulose pelas enzimas do microrganismo estudado.

A medida de concentração de celobiose mais a do ácido celobiônico mostrou que nas condições experimentais empregadas não existiu acúmulo do dissacarídeo e de seu respectivo ácido no tempo de 48 h de hidrólise, o que indica que o complexo de β -glicosidases no coquetel de *M. thermophila* foi suficiente para a conversão da biomassa à glicose nas condições ensaiadas.

7. Perspectivas

Os resultados mostraram que o fungo termofílico *M. thermophila* M.7.7. apresenta um complexo enzimático hábil, tornando-o um microrganismo promissor quando a hidrólise da biomassa é desejada.

Assim, para a otimização, a melhor aplicabilidade e o potencial emprego desse sistema enzimático, uma série de ensaios e melhoramentos ainda devem ser realizados:

- avaliação da biomassa consumida e a produção de glicose e de açúcares oxidados durante a fermentação;
- otimização da carga de proteína em função da concentração de sólidos totais maior do que 5%;
- avaliar a ação do extrato enzimático em diferentes substratos, considerando diferentes granulometrias e o estado estrutural de substratos pré-tratados e não pré-tratados;
- emprego de ferramentas biomoleculares na clonagem e expressão das enzimas de *M. thermophila* M.7.7. para futuros estudos estruturais, já que baixas concentrações de proteínas totais são obtidas a partir das fermentações do microrganismo nativo, além do possível melhoramento genético de outros microrganismos aplicados à biodegradação;
- empregar HPAEC-PAD (high pH anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection) para a detecção dos açúcares oxidados;
- empregar métodos redox para a dosagem de atividade enzimática;
- executar hidrólises enzimáticas considerando o extrato bruto do fungo estudado, além de coquetéis enzimáticos contendo enzimas do *M. thermophila* M.7.7.

Referências

- AGUIAR-OLIVEIRA E., MAUGERI F. Thermal Stability of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* Sp. **Braz J Chem Eng**, v.28, p.363-372, 2011.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de enzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: SIF, p. 242, 1991.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 13, p. 4851-61, Jul 2010. ISSN 1873-2976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042329> >.
- ANDREAUS, J.; RAMOS, L. P.; CAVACO-PAULO, A. Dry action of *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fabrics. **Journal of Society of Dyers and Colourists**, v. 116, p. 121–125, 2000.
- ARCHER, D.B.; PEBERDY, J.F. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. **Crit Rev Biotechnol**, v. 17, p.273-306, 1997.
- BADHAN, A.K. et al. Functionally diverse multiple xylanases of thermophilic fungus *Myceliophthora* sp IMI 387099. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 460-466, 2004.
- BADHAN, A.K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresour. Technol**, 98, 504 – 510, 2007.
- BADHAN, A.K. et al. Role of transglycosilation products in the expression of multiple xylanases in *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Current Microbiology**, v. 54, p. 405-409, 2007.
- BADHAN, A.K., CHADHA, B.S., SAINI, H.S. Purification of alkaliphilic xylanases from *Myceliophthora* sp. IMI 387099 using cellulose-binding domain as an affinity tag. **World J. Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 973-981, 2008.
- BAILEY, M.J., TAHTIHARJU, J. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.62 p.156–162. 2003

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Application Microbiological Biotechnology**, v.56, p.326-338, 2001.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002. Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/07388550290789568> >.

BIELY, P. Microbial xylanolytic enzymes. **Trends in Biotechnology**, v.3, p. 286–290, 1985.

BIELY, P.; VRŠANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic proprieties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 151–166, 1997.

BIELY, P. TENKANEN, M. **Enzymology of hemicellulose degradation**. In: Harman GE, KUBICEK, C. P. (eds) *Trichoderma and Gliocladium; Enzymes, biological control and commercial application*. London: Taylor & Francis Ltd.; p. 25-47, 1998.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**; Marcel Dekker; New York; 1997. 702 p.

BOHLIN, C. et al. A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal β -glucosidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 159-169, 2013/01/01 2013. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-3875-9> >.

BOURDAIS, A. et al. Wood utilization is dependent on catalase activities in the filamentous fungus *Podospora anserina*. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e29820, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558065> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BURANOV, A.U., MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial crops and products**, v.28, p.237-259, 2008.

CANNELLA, D. et al. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 10, Apr 2012. ISSN 1754-6834. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000309402700001 >.

CAÑAS, A. I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 6, p. 694-705, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1873-1899. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471466> >.

CHADHA, B.S. et al. Two endoxylanases active and stable at alkaline pH from the newly isolated thermophilic fungus, *Myceliophthora* sp IMI 387099. **Journal of Biotechnology**, v. 109, p. 227-237, 2004.

CHAUVE, M. et al. Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 3, 2010. ISSN 1754-6834. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181208> >.

CHRISTAKOPOULOS, P. et al. Antimicrobial activity of acidic xylooligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 171-175, 2003.

COBOS, A.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 810-818, 11/5/ 2003. ISSN 0141-0229. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022903002205> >.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology reviews**, v.29, p. 3-23, 2005.

CORNISH-BOWDEN, A. **Fundamentals of Enzyme Kinetics**. Portland Press; 1995. 343 p.

DALE, M. P. et al. Reversible inhibitors of beta-glucosidase. **Biochemistry**, v. 24, n. 14, p. 3530-3539, 1985. ISSN 14.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. **Appl Microbiol Biotechnol**, Aug 2013. ISSN 1432-0614. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995228> >.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**; 3rd Ed.; Academic Press; New York, 1979. 1116 p.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. In: Academic Press. New York, 2002. 439p.

DUCHATEAU, N. et al. Sucrose: Fructan 6- fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. **Plant Physiol**, v. 107, p. 1249-1255, 1995.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 1-33, 1996. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0960852495001220> >.

ELWYN, T. R.; SIU, R. G.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **J Bacteriol**, v. 59, p. 485-497, 1950.

FAULDS, C. B. et al. Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 622–629, 2006.
FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, p. 613, 1989.

FIELDS, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, n. 129, p. 417-431, 2001.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GOMES, J. et al. Production of thermostable β -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: isolation, partial purification and characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 969–975, 2007.

GORDON, C.L. et al. A glucoamylase GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. **J Microbiol Methods**, v. 42, p. 39-48, 2000.

GOUKA, R.J., PUNT, P.J., VAN DEN HONDEL C.J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Appl Microbiol. Biotechnol**, v. 47, p. 1-11, 1997.

GUSAKOV, A.V. et al. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p.1028-1038, 2007.

HALLBERG, B. M. et al. Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. **J Mol Biol**, v. 315, n. 3, p. 421-34, Jan 2002. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11786022> >.

HARREITHER, W. et al. Catalytic properties and classification of cellobiose dehydrogenases from ascomycetes. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 5, p. 1804-15, Mar 2011. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216904> >.

HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305-16, Apr 2010. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230050> >.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **J Biotechnol**, v. 78, n. 2, p. 93-113, Mar 2000. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725534> >.

HIGUCHI, T. **Biosynthesis and Biodegradation of Wood components**. Orlando: Academic Press, 1985.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747961> >.

HOSHINO, E. et al. Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 4, p. 300-306, 1997 1997. ISSN 0922-338X.

HASHIMOTO, T. et al. Production and some properties of salt tolerant β -glucosidase from a shoyu koji mold, *Aspergillus oryzae* in solid and liquid cultures. **J. Biosci Bioeng**, v. 88, p. 479-483, 1999.

HUI, J.P M.; WHITE, T.C.; THIBAUT, P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in celobiohydrolase II and endoglucanase I and II from *Trichoderma reesei*. **Glycobiology**, v.12, p. 837-849, 2002.

ISMAIL, W.; GESCHER, J. Epoxy Coenzyme A Thioester pathways for degradation of aromatic compounds. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 15, p. 5043-51, Aug 2012. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22582071> >.

IWAIHIIA, K.; TODOROKI, K.; KIMURA, H.; SHIMOI, H.; ITO, K. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound S-glucosidases from *Aspergillus kawachii*. **Biosci Biotech Biochem**, v. 62, p. 1938-1946, 1998.

IWAIHIIA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **J Biosci Bioeng**, v.94, p. 530-535, 2002.

JEON, T. et al. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnol Bioeng**, v. 98, n. 1, p. 112-22, Sep 2007. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17335064> >.

JEON, T.; WILSON, D.; WALKER, L. Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 1, p. 270-277, JAN-FEB 2006 2006. ISSN 8756-7938.

JU, L.K.; AFOLABI, O.A. Wastepaper hydrolysate as soluble inducing substrate for cellulase production in continuous culture of *Trichoderma reesei*. **Biotechnol Prog**, p.1591–1597,1999

KARNAOURI, A. et al. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. **PeerJ**, v. 1, p. e46, 2013. ISSN 2167-8359. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638383> >.

KAUR, J. et al. Purification and characterization of beta-glucosidase from *Melanocarpus* sp MTCC 3922. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 260-270, Apr 2007. ISSN 0717-3458. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248639400010 >.

KOSTYLEV, M.; WILSON, D. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. **Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 61-70, 2012. ISSN 2.

KLOCK, U. et al. **Química da Madeira**. 3a Ed. Revisada, Curitiba-Paraná, Universidade Federal do Paraná, 2005.

KREMER, S. M.; WOOD, P. M. Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **European Journal of Biochemistry**, v. 208, n. 3, p. 807-814, 1992. ISSN 1432-1033. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17251.x> >.

KUBICEK, C. P. Release of carboxymethyl-cellulase and β -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 226-231, 1981/12/01 1981. ISSN 0171-1741. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00500103> >.

KUBICEK, C. P. **The cellulase protein of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation**. In: FIECHTER A. (Ed.) *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag, v. 45, p. 2-27, 1992

KUBICEK, C. P.; PENTTILA, M. **Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma***. In: Harman GE, KUBICEK, C. P (eds) *Trichoderma and Gliocladium; Enzymes, biological control and commercial application*. London: Taylor & Francis; p. 49-72, 1998.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K. E. L. (Ed.), **Biochemical Engineering Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, v. 57, p.45-126, 1997.

KWON, K.-S. et al. Detection of β -Glucosidase Activity in Polyacrylamide Gels with Esculin as Substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4584-4586, 1994. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/60/12/4584.abstract> >.

LANGSTON, J. A. et al. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 19, p. 7007-15, Oct 2011. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821740> >.

LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 41, 2013. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514094> >.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. **J. Ferment Technol**, v. 54, p. 267-286, 1976.

MARTIN, C. et al. Enzyme loading dependence of cellulose hydrolysis of sugarcane bagasse. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1927-U61, 2012 2012. ISSN 0100-4042.

MARTINS, L.F. Caracterização do complexo celulásico do *Penicillium echinulatum*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Química de Fitobiomassas, Curitiba-Paraná, 2005.

MEDVE, J. Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of celobiohydrolase I, II and endoglucanases II. Tese (Doutorado). Lund University, Departament of Biochemistry, Lund, Sweden, 1997.

MERHEB-DINI, C. et al. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 19, p. 9210-7, Oct 2009. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19746980> >.

MERINO, S.; CHERRY, J. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. In: OLSSON, L. (Ed.). **Biofuels**: Springer Berlin Heidelberg, v.108, 2007. cap. 66, p.95-120. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology). ISBN 978-3-540-73650-9.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

MIRANDA-VIZUETE, A.; SPYROU, G. The novel oxidoreductase KDRF (KM-102-derived reductase-like factor) is identical with human thioredoxin reductase. **Biochem. J**, v. 325, p. 287–288, 1997.

MUÑOZ, I. G. et al. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporum*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CHB 58) at 1.32 Å resolution and homology models of the lysozymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 1097–1111, 2001.

NAZIR, A. et al. Regulation of expression of multiple betaglucosidase of *Aspegillus Terreus* and their purification and characterization. **BioResources**, v. 4, n. 1, p. 155-171, 2009.

OBERSON, J. et al. Comparative investigation of cellulose-degrading enzyme systems produced by different strains of *Myceliophthora thermophila* (Apinis) v. Oorschot **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 303-312, 1992.

PALONEN, H. et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I e EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **J Biotechnol**, v.107, p.65-72, 2004.

PARK, A. R. et al. Biochemical Characterization of an Extracellular β -Glucosidase from the Fungus, *Penicillium italicum*, Isolated from Rotten Citrus Peel. **Mycobiology**, v. 40, n. 3, p. 173-80, Sep 2012. ISSN 2092-9323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23115510> >.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARRY, N. J. et al. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemical Journal**, v. 353, p. 117-127, Jan 2001. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166387800013 >.

PERSSON, T. et al. Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3906–3913, 2009.

PHILLIPS, C. M. et al. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chem Biol**, v. 6, n. 12, p. 1399-406, Dec 2011. ISSN 1554-8937. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004347> >.

PITARELLO, A.P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana de açúcar à bioconversão via pré tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, Curitiba-PR, 2007.

PRADE, R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev**, Newcastle, v. 13, p. 101-131, 1995.

PULS, J.; SCHUSEI, J. **Chemistry of hemicellulose**: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: COGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. Hemicellulose and hemicellulases. London: Portland Press, p. 1-27, 1993.

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 144, p. 87–100, 2008.

RANJAN, R. et al. Adsorption of fermentation inhibitors from lignocellulosic biomass hydrolyzates for improved ethanol yield and value-added product recovery. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 122, p. 143–148, 2009.

RIBEIRO, D. A. et al. The *Penicillium echinulatum* Secretome on Sugar Cane Bagasse. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1-9, 2012.

ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274-279, 2011. ISSN 1.

ROY, S. K. et al. Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 613-618, 1991/11/01 1991. ISSN 0959-3993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00452843> >.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SCHAFNER, D.W.; TOLEDO, R.T. Cellulase production in continuous culture by *Trichoderma reesei* on xylose-based media. **Biotechnol Bioeng**, v.39, p.865–869, 1992.

SINSABAUGH, R. L.; LIPTAK, M. A. **Enzymatic Conversion of Plant Biomass**. In: ESSER, K.; LEMKE, P. A. *The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. Berlin: Springer-Verlag, p. 347–357, (Environmental and Microbial Relationships, IV), 1997.

SOUZA, A.; MORAES, M.G.; RIBEIRO, R.C.L.F. Gramíneas do cerrado: carboidratos não estruturais e aspectos ecofisiológicos. **Acta Bot Brás**, v. 19, p.81-90, 2005.

SINGHANIA, R.R. et al. Properties of a major β -glucosidase-BGL-1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1521-1524, 2011.

SINGHANIA, R.R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation form microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

STICKLEN, M.B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 433-443, 2008.

SZIJÁRTÓ, N. et al. Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 49–57, 2004.

TABKA, M. G. et al. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 897–902, 2006.

TU, M.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 398–406, 2007.

UBHAYASEKERA, W. et al. Structures of Phanerochaete chrysosporium Cel7D in complex with product and inhibitors. **Febs Journal**, v. 272, p. 1952-1964, 2005.

UFFEN, R.L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. **J. Ind. Microbial. Biotechnol**, Hampshire, v. 19, p. 1-6, 1997.

VÄLJAMÄE, P. et al. Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. **Eur. J. Biochem**, v. 266, n. 2, p. 327-334, 1999. ISSN 2.

VARDAKOU, M. et al. Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 107–112, 2004.

VISSER, H. et al. Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a Myceliophthora thermophila isolate, previously known as Chrysosporium lucknowense C1. **Industrial Biotech**, v. 7, p. 214-223, 2011.

WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 115-129, 2005.

WEBER, K.; OSBORN, M. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 16, p. 4406-4412, 1969. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/244/16/4406.abstract> >.

WEI, H. et al. Natural paradigms of plant cell wall degradation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 330-338, 2009.

WHITTAKER, M. M. et al. Glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is a new radical-copper oxidase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 2, p. 681-7, Jan 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557673> >.

WISELOGEL, A.; TYSON, S., JOHNSON, D. Biomass feedstock resources and composition . In: Wyman CE (ed) **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization**. Washington: Taylor & Francis; p. 105-118, 1996.

WITHERS, S.G., STREET, I.P. **β -glucosidase**: mechanism and inhibition, in Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation, Lewis, N.G., Ed. American Chemical Society, Washington, DC, p. 597-607, 1989.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Review**, v. 52, p. 305–317, 1988.

WOODWARD, J. Synergism in cellulase system. **Bioresour Technol**, v. 36, p. 67-75, 1991.

ZANDONÁ FILHO, A. Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas. Tese (Doutorado). Universidade do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba – PR, 2001.

ZHANG, Y.H.P., LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulose systems. **Biotechnol. Bioeng**, v. 88, p. 797-824, 2004.

Lista de manuscritos em fase final de edição

Manuscrito I

Analysing secretion and proteomic profile of the enzymatic extract from the thermophilic fungi *Myceliophthora thermophila* for biomass deconstruction applications

Hévila Brognaro dos Santos^{a,*}, José G. C. Pradella^b, Rolf Prade^c, Priscila Delabona^b,

Deise Lima^b, Eleni Gomes^d, Raghuvir K. Arni^a

^aLaboratório Estrutural e de Biologia Molecular, Departamento de Física, UNESP, ^dLaboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada, Departamento de Biologia, UNESP, Rua Cristovão Colombo, 2265, Jd. Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto-SP/Brazil; ^bBrazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, Bairro Guará, Campinas-SP/Brazil; ^cDepartment of Microbiology & Molecular Genetics, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, USA.

Abstract

The identification of new and high efficient enzymes, enabling bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels is one of the most demanding subjects in biotechnology. The interests are synergistic procedures that effectively combine traditional high-temperature pretreatment processes with thermophilic enzyme cocktails thus achieving faster cellulosic conversion rates with decreased enzyme loads. Here *Myceliophthora thermophila* was grown on integral and fractionated biomass substrates and secretomes determined by LC-MS/MS. Several glycoside hydrolase families (GHs), including GH55, GH3, GH18, GH31, GH43, GH38 and GH81 were identified mainly when grown on hemicellulosic substrates. GHs were also identified on sugar cane bagasse and microcrystalline cellulose, whereas GH7 and AA3 were the most abundant proteins. Enzyme hydrolysis assays with integral biomass and commercial substrate

showed that microcrystalline cellulose and “*in natura*” substrate have higher hydrolysis rate when compared to pretreated biomass, clearly indicating that hydrolysis of integral biomass involves accessory activities beyond the hydrolysis of glycosydic bonds.

Keywords

cellobiose dehydrogenase, *Myceliophthora thermophila*, enzymatic hydrolysis, sugar cane bagasse, submerged fermentation

1. Introduction

Biomass is a universally abundant, renewable resource useful for the production of biofuels, pharmaceuticals and starter chemicals that can be converted into plastics and other commercial composites if polymerized sugars may perhaps be extracted. Enzymatic degradation of biomass polymers into fermentable sugars is a recalcitrant process for which a complete efficient breakdown mechanism remains to be discovered.

In recent decades the application of enzymes in various biotechnical and industrial applications had a tremendous impact in process optimization and resulted in considerable increase of interest in cellulolytic and xylanolytic fungal thermophilic enzymes. Thermophilic enzymes in general tolerate higher operating temperatures than mesophilic enzymes and are stable at 60 to 80°C (Berka et al. 2011). Besides promoting hydrolysis at high temperatures thermostable enzymes also tolerate wide and extreme pH values as well as being resistant to interference of a wide variety of chemicals present in crude reaction mixtures. Therefore, thermostable enzymes present in a typical bioreactor environment are advantageous they decrease contamination levels, and increase the overall reaction performance rate resulting in the improvement of the overall process (Merheb-Dini et al. 2009).

When grown on lignocellulosic materials the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*, (isolated from nature and identified by molecular sequencing ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region), produces biomass degrading enzymes in solid-state fermentation processes, with higher thermostability than mesophilic fungi, such as *Aspergillus* sp 2M1, *Trichoderma reesei*, *Penicillium canescens* CP10, *P. janthinellum* and *Penicillium* sp (Moretti et al. 2012). So far the production of xylanases (Badhan, Chadha, Kaur, Sonia, et al. 2007) and other cellulolytic enzymes (Badhan, Chadha, Kaur, Saini, et al. 2007) has been reported. The submerged fermentation system is presently the most applied bioprocess in biotechnology, because this process can be scaled up straightforwardly, moreover all process parameters which significantly affect growth and enzyme production, such as the fermentation medium, inoculum, pH, temperature, agitation and separation can be handled and monitored easily (Singhanian et al. 2010). However more detailed information concerning the cultivation of *Myceliophthora* genus on submerged fermentation is required, as recently the high potential of cellulolytic enzyme from *M. thermophila* was recognized (Gusakov and Sinitsyn 2012). To obtain more insights about enzyme production by *M. thermophila* in submerged fermentation, shaker flasks and controlled bioreactors were performed a series of experiments, using various carbon sources and nutritional supplements. Furthermore, the proteome of selected secretomes of *M. thermophila* was analyzed, in order to qualitatively and quantitatively assess enzyme production and to analyze the potential application of these enzymes to hydrolyse pretreated sugar cane bagasse and other biomass resources.

2. Material and Methods

2.1. Microorganism and inocula preparation

Myceliophthora thermophila was grown on solid agar petri dishes in Mandels and Weber culture medium (1969) at 45°C for 7 days. The plates were scraped with a platinum loop and the spores suspended in 0.1% Tween 80 (Sigma-Aldrich) and added to a inoculum culture medium containing (in w/v%) commercial microcrystalline cellulose Celufloc 200™ (Celufloc Ind. Com. SP, Brazil), 1.0%; glucose, 1.0%, peptone, 0.1% and Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA), 0.1%. The inoculum was incubated at 45°C, 250 rpm for 72h.

2.2. Experiments in shaken flasks

Twenty ml of inoculum suspension prepared as above were transferred to 1 L Erlenmeyer flasks containing 200 mL of Mandels and Sternberg culture media (1976) with 1% (w/v) of the following carbon sources: steam-exploded sugar cane bagasse (SET), delignified steam-exploded sugar cane bagasse (DSET) both prepared as described by Rocha (2011), Celufloc 200™ (EC), wheat bran (WB); soybean mill (SM), glycerol, lactose, sucrose and commercial fructooligosaccharides (FOS) (Corn Products Inc. SP., Brazil). Supplementation assays were performed using the above carbon sources in different proportions. Incubation were made in an orbital shaker (Innova 44R; NBS, USA) for up to 120 h at 45°C and 250 rpm. Sample withdrawal was performed daily for determination of enzyme activities and protein concentration.

2.3. Bioreactor experiments

Fermentation assays were performed in a lab-scale bioreactor (Bioflo ® 115, NBS, USA) with a working volume of 1.5 L, using SET, sucrose and WB as carbon sources. The inoculum was 10% of the working volume. Other media components were as described in Mandels and Sternberg (1969). Fermentations were conducted in batch or

pulse-fed batch procedure, the dissolved O₂ concentration was > 30% of air saturation and mechanical stirring was performed with two Rushton type impellers, in the range of 200 to 400 rpm. Prior to use all equipment was sterilized for 30 minutes at 121°C. Automatic pH control was done using a 0.4 M HCl and NH₄OH aqueous solution 3:1 (v/v). Foaming was controlled as required by manual addition of sterile antifoam polypropylene glycol 2000 (Dow Chemical, SP, Brazil). Samples were withdrawn under sterile conditions daily, centrifuged at 12.000 rpm for 25 minutes at 4°C and supernatants collected for FPase, xylanase, β -glucosidase and total protein measurements. All experimental conditions and process parameters are summarized in Table 2.

2.4. Enzymatic activity assays

The filter paper activity (FPase) was determined as described by Ghose (1987), with modifications to reduce the scale of the procedure by a factor of ten. Xylanase activity was determined by the method described by Bailey & Poutanen (1989). Released reducing sugars were measured by the dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959), using glucose and xylose as standards respectively. The activity of β -glucosidase was measured using p-nitrophenol- β -D-glucopyranoside (pNPG) (Sigma-Aldrich, USA) as substrate, according to Zhang (2009). The total protein content was measured in microplates using Bio-Rad assay reagent (Bio-Rad Laboratories, USA), using a procedure based on the Bradford method (Bradford 1976). Bovine serum albumin was used as standard.

2.5. Mass spectrometry analysis (LC-MS/MS)

Myceliophthora thermophila was inoculated on glucose (GLC), mix of avicel (AV) and carboxymethylcellulose (CMC) (1:1, CEL), mix of beechwood, oat spelt and birchwood xylan, arabinan and wheat arabinoxylan (1;1:1:1:1, XYL), on *in nature* sugar cane bagasse (INSC), SET and DSET up to 36 h. The fermentation was performed

as described in section 2.1 and 2.2. Supernatants were concentrated by ultrafiltration (10 kDa cutoff) to 100 µg of total protein and applied on a SDS 12% polyacrylamide gel as described by Weber & Osborn (1969). The gel bands were cut out, separated and treated for LC-MS/MS analysis as described by Shevchenko (1996) with some modifications. All MS/MS data were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.2.04), set up to use a NCBI *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464-subset database for search, considering the digestion enzyme trypsin. Mascot search was performed with a fragment ion mass tolerance of 0,60 Da and a parent ion tolerance of 6,0 ppm. Scaffold (version Scaffold_4.0.7, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate the MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if the probability was higher than 34,0% and achieving an FDR less than 5,0% by the Scaffold Local FDR algorithm. Protein identifications were accepted if at least 2 identified peptides showed a probability higher than 79,0% to achieve an FDR less than 5,0%. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii et al. 2003).

2.6. Enzymatic hydrolysis using *M. thermophila* crude enzymes

Enzymatic hydrolysis experiments were carried out on EC, INSB, SET and DSET at a final concentration of 5% (w/w) of substrate total solids (TS) in 125 mL Erlenmeyer flasks. Fifty mL of the crude enzymatic extract from INSB fermentation (0.05 mg of total protein/g of glucan) was the total protein amount loaded and operated at 50°C and applying an agitation speed of 200 rpm. All experiments were performed in duplicates. Samples were withdrawn at 0, 6, 12, 24 and 48 h and the glucose, cellobiose, xylose, arabinose, acetic, formic and levulinic acids concentrations (g/L) were measured by HPLC Dionex Ultimate 300 system equipped with a refractive index detector (HPLC-RI) using an Aminex ®HPX-87H and eluted with 5 mM H₂SO₄ at 0.6 mL/min. Sugars

and acids in control samples containing only the respective substrate and citrate buffer 50 mM pH 5.0 were also measured. All samples were filtered using a Millex TM 0,22 μ m filter prior to further analysis.

3. Results and discussion

3.1. Effect of carbon source upon cellulolytic and hemicellulolytic enzyme production

To assess the production of cellulases, xylanases and β -glucosidases, a series of agro industrial waste products and nutrient supplements were tested in submerged fermentation flasks. SET, DSET, WB and EC were inoculated and cultivated individually. Some dual mixtures of residue-residue and SET with soluble carbon sources (FOS, glycerol, lactose and sucrose) were also tested. The highest activity values for FPase, xylanase and β -glucosidase are summarized in Table 1.

Among the different tested carbon sources steam-exploded sugarcane bagasse (SET) was the best inducer for FPase activity as it showed after 48 h of cultivation a value of 0.23 FPU/ml (specific activity of 1.91 FPU/mg of protein), followed by SET supplemented with lactose in a ratio 3:1 showing after 72 h a value of 0.19 FPU/ml (specific activity of 1.58 FPU/mg of protein).

A decrease of the SET:lactose ratio to 1:1 lead to possible catabolite repression of FPase activity (Table 1). Oberson (1992) performed a comparative research in different strains of the fungus *Myceliophthora thermophila* not observing growth increase or enzyme production efficiency when lactose was used as the sole carbon source.

SET supplemented with glycerol and SET plus sucrose resulted in maximum activity similar to that of SET:lactose with a ratio 3:1, indicating that both supplements interfere with the production mechanism of cellulases, however was

observed that the maximum FPase activity time was shifted from 72 h when lactose was the supplement to 96 h when glycerol and sucrose were used. The remaining substrates showed activities less than 0.13 FPU/ml resulting in a reduced production of cellulases measured for FPase method.

The best carbon sources for the production of xylanases was SET plus FOS after 48 h incubation, SET with lactose in a ratio of 1:1 and SET plus sucrose, both after 72 h incubation. FOS is composed of kestose, nystose and fructofuranosyl nystose, which are polymers derived from sucrose homologous, consisting of oligo and polysaccharides of non-reducing fructose, usually joined by β (2-1) and β (2-6) bonds linked to a molecule of glucose, or sucrose in the case of fructofuranosyl (de Souza et al. 2005; Duchateau et al. 1995). FOS is an excellent xylanase inducer, however FPases and β -glucosidases were not detected. Badhan (2007) also observed increased expression of xylanase in *Myceliophthora* sp. IMI 387099 after submerged fermentation with a culture medium containing xylan and supplemented with fructose monosaccharide, indicating an up-regulation of these enzymes by this monosaccharide.

The second best source producing xylanases was SET plus lactose with a ratio 1:1. When the ratio was 3:1 the xylanase activity was reduced, indicating that the disaccharide up-regulates the production of xylanases. On the other hand it has been noticed that higher lactose concentrations down-regulate cellulolytic system. SET and SET plus sucrose and SET plus glycerol exhibited a stable production throughout cultivation time. Badhan (2007) also observed a non-repressive effect during the production of xylanases when glycerol was added to the medium. EC, SET plus WB and DSET show similar profiles and lower xylanase activities. The WB sole carbon source results also in a reduced xylanase activity after 48 h of culture incubation.

In order to obtain further insights about the enzymatic production system, additional experiments were performed to assess the effect of SET carbon source ranged from 1% up to 3% (w/v) and the inoculum concentration from 10 up to 30% (v/v). Overall the xylanase production was not affected, however a decrease of FPase and β -glucosidase activities was observed (data not show). Thus, the xylanase expression system from *Myceliophthora thermophila* in SET is free of catabolic regulation.

Production of β -glucosidase was induced when WB was the carbon source, followed by SET plus WB in 72 h. According to Singhanian (2011) WB is a rich source of nutrients comprising proteins, cellulose, starch and minerals and apparently it may promote growth and enzyme production. *Aspergillus niger* NII 08121 also shows maximum β -glucosidase activity when WB was used as carbon source, whereas cellulose and lactose showed lower activities (Singhanian et al., 2011). WB was also the best source for *Aspergillus niger* NRRL 599 to produce β -glucosidase; on lactose the β -glucosidase activity of the same *A. niger* was lesser than 50% compared to WB (Zahoor et al. 2011). In submerged cultivation the thermotolerant fungus *Aspergillus terreus* AN1 showed the β -glucosidase production induced by fructose, cellobiose, paper, corncob and wheat straw substrates (Nazir et al.; 2009).

SET plus lactose at a ratio of 3:1, glycerol and sucrose showed similar profiles with maximum activity at 120 h of cultivation. As observed for FPases, SET plus FOS and lactose, suppressed the β -glucosidase synthesis (Table 1).

In general, DSET and EC did not serve as a suitable inducing carbon source for any of the enzymes analyzed, however the deconstruction of the DSET was visually noticed, such as SET and INSB in the submerged cultivation. Thereby results indicate that further studies about *M. thermophila* proteomics and specific hydrolysis

experiments must be done to verify the main secretome profile and enzymatic efficiency of the fungus applied to the disruption of the biomass.

3.2. Bioreactor experiments

To determine the profiles of FPase, xylanases and β -glucosidases in batch and fed-batch bioreactor modes, experiments at settled and controlled pH, temperature, agitation and dissolved oxygen concentration were employed using the best carbon sources selected when *M. thermophila* was growing on shaking flasks conditions.

The different performance values for activity and protein concentration are shown in Table 2. Run #1 and Run #2 were carried out at pH 5.0 and 45°C differing only in the pulse regimen. Run #1 used one single 5g SET pulse; Run #2 was performed applying two 5 g SET pulses at 48 and 96 hours. Run #3 was carried out at the conditions of Run #2, however the pH was 6.0. Run #4 was equal to Run #3 however the initial temperature was 38°C until 96 hours, when a single pulse supply of 5 g of SET was added to the system. Before adding the pulse the temperature was reduced to 29°C until the end of the experiment. Run #5 and Run #6 were carried out at standard batch mode conditions (45°C and pH 6.0) using SET plus sucrose (3:1) and WB as carbon sources respectively. Figure 1 displays the time evolution of the experiments in terms of measured enzyme activities and protein concentrations.

M. thermophila bioreactor cultivation was conducted by the fed batch mode and surprisingly showed a reduction in cellulose activity when compared to the shaker flask experiment, when SET was the carbon source (Fig. 1A and B). Assays employing the same set of fed conditions and temperature at different pH values (5.0 and 6.0) also showed no significant differences in the activities of FPases and xylanases, however with a slight increase of β -glucosidase activity when performed at pH 6 (Fig. 1B and C).

It is known that thermophilic fungal proteases exhibit optimal activity between 40 and 70°C (Merheb-Dini et al., 2009). Seeking to minimize the influence of proteolytic enzymes in the process, cultivation was conducted at 38°C and prior to feed pulse (at 96 h) the temperature was reduced to 29°C (Fig. 1D). Again no significant gain in activity of FPases, xylanases and β -glucosidases was observed.

Despite of SET plus FOS have shown greatest activity in the shaker, SET plus sucrose was the carbon source selected to analyze xylanase production in the bioreactor, due xylanases production has remained stable for 120 h of fermentation in shaker experiments (data not show). The bioreactor assay applied SET plus sucrose (Fig. 1E) showed maximum xylanase activity 24 h previous, but lower than in shaker assay (Tables 1 and 2).

Both, shaker and bioreactor procedures favored the metabolism of *M. thermophila* inducing the biosynthesis of β -glucosidases when WB was the carbon source showing maximum β -glucosidase activity 24 h previous in the bioreactor than obtained in shaker (Fig. 1F).

In conclusion, bioreactor experiments demonstrated that carbon sources SET supplemented with sucrose (Fig. 1E) and only WB (Fig. 1F) stimulate the production of FPase and β -glycosidases. Overall the pulses of SET at different time intervals and pH values held at 5.0 or 6.0 did not enhance any particular enzyme activity in the bioreactors. Temperature reduction from 38 to 29°C appeared to have some influence on protein production, probably because alleviation of protease activity. However, further investigations on proteolytic activity are still required.

In general the results show that is possible to use a submerged bioreactor with *M. thermophila* to produce glycohydrolases from agricultural waste and raw materials.

3.3. Proteomic response of the *Myceliophthora thermophila* secretome

To determine and characterize proteins secreted by *M.thermophila*, when growing on five different biomass fractions and growing on glucose as sole carbon source, the extracellular protein extracts were analyzed in detail by LC-MS/MS.

After 36 h of cultivation the six supernatants were concentrated, applied to SDS-PAGE and gel bands used for LC-MS/MS analysis. For protein identification the LC-MS/MS spectra were analyzed applying the Mascot Ions Search software (Matrix Science, UK) and the Scaffold Proteome Software Inc. (Portland, OR) using the NCBI *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 database, containing all non-redundant proteins of *M. thermophila*.

All spectra acquisitions were analyzed under 5% FDR and considering at least 2 identified peptides. In all 187 *M. thermophila* secreted proteins were identified from 7327 unique peptides characterized by mass spectroscopy. 72 proteins were found to be present in all six growth conditions (6115 unique peptides). Eight proteins were INSB-specific (23 unique peptides), 5 DSET-specific (12 unique peptides), 4 SET-specific (12 unique peptides), 6 CEL-specific (17 unique peptides), 11 XYL-specific (51 unique peptides) and 5 glucose-specific (10 unique peptides). 76 proteins were identified at least on two carbon sources (1051 unique peptides).

The majority of the matches belong to protein identities already deposited in the CAZy database, which is a database dedicated to carbohydrate active enzymes (www.cazy.org). 80% of the enzymes secreted by *M.thermophila*, applying the six different carbon sources, correspond to entries in the CAZy database. The results obtained indicate that *M. thermophila* has a unique, extended and wide range hemicellulolytic enzymatic system.

Overall the glycoside hydrolases, GH55, GH3, GH18, GH31, GH43, GH38 and GH81 were the most abundant enzymes, mainly when XYL was the carbon source, reaching 63% of the total identified proteins (Fig. 2). Xylanases were identified (GH10 and GH11) and mainly secreted when xylan and INSB was the carbon source. Further most abundant glucosidases (GH1, GH17, GH30), galactosidases (GH2), manosidases (GH47, GH92), mananases (GH26), amylases, glucodextranases, glucanases (GH13, GH15, GH16, GH71) and fucosidases (GH95) were secreted. Several other GH families were identified, however they correspond to a lower number of unique peptides (supplementation data Table S1).

The percentage of GHs decreased 25% comparing commercial xylan and cellulose as cultivation medium, which CEL secreted 38% of GHs enzymes. The INSB, DSET and SET medium resulted in a GHs secretion of 47, 49 and 46% respectively. On the other hand 22% of cellobiohydrolases, GH6 and GH7 (CBHs), were secreted on CEL (37 and 97 unique peptides, respectively), 13% on INSB (25 and 90 unique peptides) and 16% were secreted on both pretreated bagasse (13 and 90 unique peptides to DSET and 24 and 100 to SET). CBHs showed a lower number of identified peptides when xylan was the carbon source, corresponding to only 6% of the total secreted proteins. Also endoglucanases, (GH5, GH12 and GH74) are secreted to a relative low level, 3% with CEL, INSB, DSET and SET and 2% with XYL as medium (Fig. 2). In this case the different degree of polymerization, cristallinity index, surface area, porosity, hemicellulose content, lignin barrier and biomass composition can not be assigned to be the regulating factor for the secretion of endoglucanases, as was observed for several other *M. thermophila* glycoside hydrolases (unique peptides count in supplementation data table S1). Two carbohydrate binding modules family 1 (CBM1) (24 and 12 unique peptides) were not only identified in glucose and xylan medium, WSC binding (59

unique peptides) and a domain resembling a carbohydrate-binding family 1 segment (38 unique peptides) were identified in all growth conditions. Although some CBM matches were identified, they only match up to 2% considering all carbon sources. *M. thermophila* secreted also some polysaccharide lyases (PL1, PL3, PL4 and PL20) and carbohydrate esterases (CE1, CE3, CE8 and CE16) however, as found for the CBMs, both enzyme classes are secreted at low levels (Figure 2). All unique peptides used to identify CBM, PL and CE enzymes are shown in supplementation data table S2.

Recently some enzymes, have been reclassified and assigned within the new Auxiliary Activity families (AAs) in the CAZy classification database (Levasseur et al. 2013, Horn et al. 2012). Our results indicate that AAs reached 16% on CEL, 12 and 13% on INSB and SET, 7% and 6% on DSET and XYL respectively (Fig. 2). Most AAs matches correspond to the AA3 glucose-methanol-choline oxidoreductase (GMC). The GMC oxidoreductases are flavoproteins containing a flavin-adenine dinucleotide (FAD) binding domain and are divided into 4 subfamilies. The subfamily AA3_1 contains Cellobiose Dehydrogenases (CDHs), which oxidize the C1 anomeric position of cellobiose or longer cellodextrins to the corresponding cellobiono-1,5- δ -lactonas or cellobionolactona, which are spontaneously or enzymatically hydrolyzed to aldonic acids, while FAD is reduced to FADH₂ (Hallberg et al. 2002) and enzymes belonging to the subfamilies AA3_2 and AA3_3 catalyze several aromatic and aliphatic alcohols to aldehydes and H₂O₂. The forth subfamily is named AA3_4 resembles pyranose oxidases. This enzymes catalyze the C2 oxidation of D-glucopyranose and structurally analogous mono and disaccharides to the corresponding sugars, while reducing O₂ and H₂O₂. Enzymes of all four subfamilies participate in the generation of hydroxyl radicals via the Fenton reaction, thereby potentially oxidizing lignin (Harreither et al. 2011, Levasseur et al. 2013, Phillips et al. 2011).

The AAs protein matches identified two cellobiose dehydrogenases secreted in high amounts in all growth conditions, applying 222 and 101 unique peptides and one AA3_1 type enzyme (19 unique peptides), which was less secreted on glucose. Four matches corresponding to the AA3_2 family, resembling aryl-alcohol oxidases and glucose oxidases, were also identified on different bagasses and one of them was also upregulated in all growth conditions. Peptides matching alcohol oxidases (AA3_3), the last AA3 family found, were identified only on CEL and INSB (2 and 4 unique peptides, respectively).

A glyoxal oxidase (copper radical oxidase), belonging to the subfamily AA5_1, which oxidizes simple aldehydes to the corresponding carboxylic acids (Whittaker et al. 1996), was also identified in all secretome conditions (85 unique peptides) showing the lowest unique peptide count on the glucose standard.

Lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) belonging to the auxiliary activity family 9 (AA9), previously classified as GH61 (Harris et al. 2010) were also secreted. However only seven matches were identified with a relative low number of unique peptides in all secretomes, even though *Myceliophthora thermophila* fungal has 22 LPMOs genes encoding them in its genome (Levasseur et al. 2013). In spite of the low number of unique peptides identified, it was interesting to notice that LPMOs are up regulated when *M. thermophila* grew mainly on commercial cellulose (32 unique peptides) and INSB (18 unique peptides) suggesting that the sugar cane bagasse pretreatment modify the cellulose structure which may unfavored the AA9 biosynthesis. Recently studies demonstrated that LPMOs can act synergistically in cellulose hydrolysis with CDHs by coupling the cellobiose oxidation to the reductive activation of LPMOs, increasing the cellulose conversion (Phillips et al. 2011, Langston et al. 2011, Dimarogona, Topakas, and Christakopoulos 2013). However the secretome analysis

showed an over-expression of CDHs but under-expression of LPMOs, suggesting that CDHs can use also other electron acceptors beyond LPMOs. Therefore it can be either supposed that enzymes of the AA9 family are highly specific and the oxido reductive cycle occurs fast enough to recover these enzymes to their initial redox condition, considering the mechanism proposed by Phillips et al., 2011, or LPMOs remain firmly bound to lignocellulose and were therefore under-represented in the microenvironment analyzed. The supplemental Table S3 shows the unique peptides corresponding to the seven LPMOs matches.

Enzymes of the Auxiliary Activity family 1 were also found mainly on XYL, INSB and SET with 15, 14 and 10 unique matching peptides, respectively. This class has three subfamilies, laccase (AA1_1), ferroxidase (AA1_2), which catalyze the oxidation of phenolics, aromatic amines or other electron-rich substrates via reduction of oxygen to water (Cañas and Camarero 2010), and the subfamily AA1_3 named laccase-like multicopper oxidase. Matches from ferroxidase were not found on *M. thermophila* secretomes.

A FAD oxidase-like protein was identified in the secretome grown on CEL (2 unique peptides), on XYL, INSB (5 and 4 unique peptides in each condition) and on SET (3 unique peptides). According to Levasseur (2013) this enzyme is a gluco-oligosaccharide oxidase classified to be member of the AA7 family. The characteristic enzymatic feature of this enzymes is oxidizing the C1 hydroxyl groups of β -1,4 linked sugars through two half-reactions featuring the oxidation of the reducing sugar to the lactone and spontaneous hydrolysing the corresponding acid, being able to oxidize mono, di- and cello-oligosaccharides with concomitant reduction of O_2 to H_2O_2 .

Overall seventeen protein matches with predicted function were identified, but only four of these show a high number of unique peptides corresponding to catalase, a

aldose epimerase like protein, a piridine nucleotide-disulfide oxireductase like protein and a extracellular aldolactonase (supplementation data Table S4).

Catalases are enzymes that play critical roles in protecting cells against the toxic effects of hydrogen peroxide, that are constantly generated as byproducts of aerobic metabolism and through enzymatic activities (Bourdais et al. 2012). The secretome analysis identified also enzymes belonging to the H_2O_2 -generating enzyme families (AA3_3, AA7, AA3_2 and AA5_1), which were under-expressed on glucose medium, suggesting a function reducing the H_2O_2 level in this secretome. However the catalase was up regulated in all carbon sources and on glucose as well. Aldose epimerase, a enzyme responsible for the anomeric interconversion of D-glucose and interconversion of other aldoses between their α - and β - forms (www.ebi.ac.uk) was clearly identified and correlated to a significant number of unique peptides, matching even when D-glucose was used as carbon source. The results confirm that aldose epimerase is functional activated for the glucose metabolism, turning the saccharide over to the best anomeric configuration for assimilation. The pyridine nucleotide disulphide oxidoreductase family, identified in all growth conditions, comprises an important group of enzymes which catalyse electron transfer between NAD(P)(H) and a disulphide/dithiol (Miranda-Vizuete & Spyrou, 1997). The extracellular aldonolactonase responsible for catalyzing the hydrolysis of glucono- δ -lactone and cellobiono- δ -lactone was also identified in all carbon sources, showing highest unique peptides on DSET (12 unique peptides), SET and CEL (11 unique peptides in both growth medium). The number of corresponding peptides was reduced applying the glucose growth medium, indicating its under-expression within this secretome. Beeson (2011) investigated expression levels of two unique extracellular lactones from *M. thermophila* and also found out that this enzymes are also expressed on glucose, however up regulated 6-fold higher when avicel was applied as growth carbon

source. The other thirteen non-cazy class proteins were identified independently from the carbon sources used. A intradiol ring cleavage dioxygenase like enzyme was identified only when xylan was used as growth medium (2 unique peptides). The enzyme is responsible for the aromatic ring cleavage between hydroxyl groups under oxic conditions (Ismail and Gescher 2012). A NADP⁺D-xylose dehydrogenase was identified in the SET secretome (5 unique peptides), being able to reduce sugars to xylitol by a D-xylose reductase. The xylitol can subsequently oxidized to D-xylulose by a xylitol dehydrogenase (Berghäll et al. 2007). Further matches correspond to four peptidases, one belonging to the peptidase M14 carboxypeptidase A/B like subfamily, two are identified to be zinc-peptidases and one peptidase being member of the family S53, which was identified only on cellulose as growth source (2 unique peptides). Asparaginase, tyrosinases, phospholipase, phosphatase like protein and one serine protease were also identified even though with relative low unique peptides. (supplementation data Table S4).

Most of the hypothetical protein matches identified showed low unique peptides, however some proteins seem to be important in the biodegradation pathway (supplementation data Table S5). The hypothetical proteins, gi accession number 347011745 and 347011921, were identified in all growth conditions including also the glucose growth medium. The others hypothetical proteins were regulated according to the complexity of the carbon source, i.e. the match to the hypothetical protein gi accession number 307007100 corresponds to 28 unique peptides only when xylan was applied as growth medium.

3.4. Top 30 enzymes of the *Myceliophthora thermophila* secretome profile

To verify the 30 most abundant matches of the *M. thermophila* secretome produced from *in natura* (INSB) and pretreated sugar cane bagasses (SET and DSET),

from mix of AV and CMC (CEL) and from commercial xylans (XYL) the glucose count rate in the secretome spectrum was used as reference to normalize, in context to the respective carbon source applied, the occurrence of enzymes belonging to the top 30 rank.

In case of sugar cane bagasses the INSB was used as reference to classify the top 30 matches. Therefore the top 30 rank to sugar cane bagasses, CEL and XYL (supplementation data Table S6) shows the carbon source influence on the secretome regulation and content.

The highest expression level, considering only the sugar cane bagasses and CEL, was observed for cellobiose dehydrogenase (AA3_1) and two different cellobiohydrolases (GH7), which changed their rank position dependent to the carbon source used for growth. One further GH7 was found in lower quantities and classified on both substrate media. The AA3_1 and GH7 families were not found in top 30 rank applying commercial xylan. GMC oxireductase and glyoxal oxidase (AA3 and AA5_1), endoglucanase (GH74), β -mannanase (GH26) and β -D-xylosidase (GH43) also were classified, however only on bagasses and CEL media. Evaluating the top 30 enzymes corresponding to the bagasses and XYL growth media, distinct GHs enzyme families, one polysaccharide lyase family 1 (PL1) and one hypothetical protein (accession number 347009809) were classified. Among the GHs, endo- β -1,3-glucanase (GH81), glucan-1,3- β -glucosidase (GH55), α -xylosidase (GH31) and β -xylosidase (GH43) belong to the best TOP classified.

The α -mannosidase (GH38) was extremely upregulated on xylan and was assigned to the TOP 1 rank in this source. In spite of the fact that mannosidase is a hemicellulolytic enzyme, it was also classified to be among the TOP 30 applying cellulose as growth medium, getting the 17th position. The secretome analysis shows that GH38 was under-expressed only on INSB and over-expressed on SET and DSET. Since

SCBIN contains a native xylan amount and in spite of the fact that polysaccharides are less exposed in this bagasse, the result suggests that GH38 seems to have more functions beyond the known mannan hydrolysis. The α -1,3-glucanase (GH71) was also classified to be among the TOP 30 on XYL and CEL, however showed lowest TOP classification applying both carbon sources as growth medium. Glycoside hydrolyse families 2, 3, 30, 47, 18, and the putative proteins pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase, aldose epimerase and a hypothetical protein (acession number 307011745) are in the TOP 30 list using all carbon sources growth conditions.

Applying commercial cellulose, cellobiose dehydrogenase (AA3_1), β -1,4-cellobiosidases (GH6), endo- α -1,4-polygalactosaminidase (GH114), α , α -trehalase (GH37), endo-1,4(3)- β -xylanase (GH10) and endo- β -1,3(4)-glucanase (GH16) were also upregulated and found to be among the TOP 30. Two GH10s were identified in almost all carbon sources (supplemental Table S1), but only one shows a normalized spectrum count for the CEL secretome, ranking the enzyme to be in the TOP 30. Further, a zinc-peptidase and extracellular aldonolactonase are among the TOP 30 rank, however only when the cellulose medium was applied.

As reported by Levasseur (2013), *M. thermophila* encodes three CDHs (AA3_1) which in general are upregulated under cellulolytic carbon source conditions (Henriksson, Johansson, and Pettersson 2000). Two CDHs were classified in the commercial cellulose TOP 30 rank and their catalysis product is known to be capable to inhibit many different types of glycosyl hydrolases (CONCHIE and LEVVY 1957), thereby an extracellular aldonolactonase was also upregulated and getting a rank on cellulose growth medium as well. This enzyme may function synergistically with CDHs and supporting the conversion of cellobionolactonas and lactonas to cellobionic and aldonic acids, respectively. (Mansfield, De Jong, and Saddler 1997, Beeson et al. 2011).

Glucoamylase (GH15), fucosidase (GH95), mannosyl-oligosaccharide mannosidase (GH92), α -amylase (GH13), GH43, carbohydrate esterase family 8 (CE8) and three hypothetical proteins gi accession number 347010366, 347005727 and 347009809 were only classified on xylan and are part of the TOP 30 rank. The results of investigations confirm that *M. thermophila* secretes in total seven different GH43s for all carbon sources, from which four are among the TOP 30 ranking. The result particular suggests that GH43 is an important enzyme for the disruption of the lignocellulosic. Further, catalase was upregulated in all carbon sources, however it was classified to be in the TOP list only for the sugar cane bagasses secretomes, mainly on SETD (supplemental Table S6).

3.5 Enzymatic Hydrolysis using crude extract from *M. thermophila*

The crude protein extract from INSB was identified to be the best one to perform the enzymatic hydrolysis as the mass spectroscopy analysis shows a high diversity of Cazy enzymes.. Furthermore INSB is not a chemical pretreated biomass, which therefore provides new and valuable insights about the natural biodegradation system of *M. thermophila*.

The biomass hydrolysis experiments were performed on four different substrates, celufloc (EC), INSB, SET and DSET, the enzyme loaded was 0.05 mg of total protein per gram of glucan (previously assays were done to evaluate the enzyme load saturation, data not shown). To detect mono-, disaccharides and acids released, HPLC-RI was used as a metric to monitor and analyze the conversion. Glucose, cellulose, xylose, arabinose, acetic, formic and levulinic acids were measured.

The results show that even using low amounts of protein and crystalline cellulose, the enzymes obtained from INSB crude extract could access the substrate, release particular soluble saccharides and convert them to glucose. However, HPLC-RI

has been used only to quantify saccharides and as oxidative enzymes were present in the crude extract the co-elution of glucose, gluconic acid (Glc,GlcA) and cellobiose, cellobionic acid (GlcGlc,GlcGlcA) was measured. Thereby the glucose and cellobiose amounts were in principle overestimated due the aldonic acids (oxidized sugar) released by a oxidative enzymatic system (Cannella et al. 2012).

Despite of the co-elution, EC shows the highest Glc/GlcA concentration, followed for INSB, DSET and SET, respectively (Figure 3A). Thereby the microcrystalline commercial cellulose showed to be the more accessible and able substrate to the biomass disrupting using INSB crude enzymatic extract. Despite of reduced crystallinity and degree of polymerization the mechanically pretreated INSB substrate also was disrupted for the *M. thermophila* crude extract, which may have happened because the increase of the specific surface and reduction of its particle size favoring glucan and xylan acessibility to the enzymatic attack (Alvira et al. 2010). The delignified sugar cane bagasse (DSET) pretreatment also lead to an increase of the internal surface area, a decrease in the degree of polymerization and crystallinity (Martin et al. 2012) showing Glc/GlcA concentration higher than SET, indicating this last pretreatment is not sufficient to overall enhance the enzymatic hydrolysis of *M. thermophila* (Fig. 3A). A substantial number of studies show the importance of the crystallinity and degree of polymerization on hydrolytic rates. Experiments consider the type of biomass pretreatment, the dosage, efficiency and synergism between enzymes.

Therefore it seems likely that the synergistic effect observed for the *M. thermophila* enzymatic system not only dependents on the significant chemical differences, presented by the variety of pretreated substrates, but also dependents of the microcrystallinity and available surface area of each substrate. Some studies demonstrated the processive nature of individual enzymes and their mixtures on filter

paper, avicel, bacterial microcrystalline cellulose (BMCC), cotton and phosphoric acid swollen cellulose (Hoshino et al. 1997, Langston et al. 2011, Jeoh, Wilson, and Walker 2006, Våljamäe et al. 1999, Jeoh et al. 2007). However the authors elucidated the molecular synergistic mechanism by just loading celobiohydrolases and endoglucanases on the different crystalline substrates and found out a lower synergism applying higher ordered cellulose. In contrast Langston (2011) analyzed the oxido reductive cellulose depolymerization system applying native and recombinants CDHs and AA9 families supplemented by cellobiohydrolases and endoglucanases, resulting in increases for the microcrystalline cellulose conversion, on avicel and even on BMCC, which was reported to decrease in experiments reported previously by Våljamäe (1999) and Jeoh (2007). Two studies of AA9 from *Thermoascus aurantiacus* and *Neurospora crassa* showed the ability of AA9 to enhance the activity of cellulase by the presence of CDH (Kostylev and Wilson 2012).

For the EC hydrolysis the GlcGlc/GlcGlcA concentration was highest and remained constant between 12 and 24 hours (Figure 3B), probably because high amount of cellobionic acid generated by CDH and cellobiose generated by the accompanying cellulases. To support the specificity of CDH for crystalline structures INSB substrate was also converted applying the crude enzymatic extract, however GlcGlc/GlcGlcA accumulation was not observed, suggesting its conversion was not affected by a inhibition of β -glucosidase (Parry et al. 2001, Dale et al. 1985). Moreover, a lower CDH oxidative turnover must have happened, because the lower INSB accessibility results in a low concentration of cellobionolactone release, probably also followed up by a slow conversion via β -glucosidase to glucose and gluconic acid (Cannella et al. 2012). CDH is the most up regulated enzyme in INSB secretome and it sounds to be the most important auxiliary enzyme necessary to convert lignocellulosic biomass, as it first disrupts the

tightly microcrystalline cellulose regions which in consequence releases the oligosaccharides chains end allowing cellobiohydrolases to act on and to initiate cellulose cleavage. Moreover, also opening the substrate structure that endoglucanases can reach and act on amorphous areas. Beside CDH, two different GH7 enzymes were identified to be the most important to hydrolyse sugar cane bagasse, suggesting a synergistic mode of action in the enzymatic process of cellulose hydrolysis, predicted already by Reese (1950). Both pretreatments, steam explosion and steam explosion plus delignification, did not show effects supporting the accessibility and digestibility of cellulose, supposing that the INSB crude enzymatic extract has already the necessary system allowing a complete degradation.

Acetic acid, xylose and arabinose were also detected in the hydrolyzates. The production and quantities detected were found to be substrate dependent. For example acetic acid was observed only after the hydrolysis of INSB (data not shown), because the acetyl groups are found in natural bagasse hemicellulose (Alvira et al. 2010). INSB and EC showed the highest concentration of xylose. For EC the prior performed chemical composition assays showed a content of 15% hemicellulose (Ribeiro et al. 2012), whereas DSET and SET showed an average content of only 6.5% (Martin et al. 2012, Rocha et al. 2011), which results in the lowest xylose concentration. Arabinose was detected only in celufloc and INSB.

4. Conclusions

In summary the results show that the *M. thermophila* secretome contains a wide proteomic system able to effectively disrupt crystalline carbon sources and able to act synergistically on *in natura* sugar cane bagasse. The data presented confirm that bagasses pretreated were less converted to glucose and gluconic acid, suggesting that the decrease of polymerization results in less disruption and promotes a lower synergistic

effect between the classical hydrolytic and the newly oxidative system. Overall the fungus is an industrial and scientific highly interesting microorganism and the knowledge of its hydrolytic activities and pathways support the improvement and development of innovative procedures for lignocellulosic biomass conversion.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian agencies CNPq and FAPESP for financial support, and the technical staff of the National Laboratory of Science and Technology of Bioethanol (CTBE).

References

- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro. 2010. "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review." *Bioresour Technol* no. 101 (13):4851-61. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.
- Badhan, A. K., B. S. Chadha, J. Kaur, H. S. Saini, and M. K. Bhat. 2007. "Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099." *Bioresour Technol* no. 98 (3):504-10. doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.009.
- Badhan, A. K., B. S. Chadha, J. Kaur, K. G. Sonia, H. S. Saini, and M. K. Bhat. 2007. "Role of transglycosylation products in the expression of multiple xylanases in *Myceliophthora* sp. IMI 387099." *Curr Microbiol* no. 54 (6):405-9. doi: 10.1007/s00284-006-0204-5.
- Beeson, W. T., A. T. Iavarone, C. D. Hausmann, J. H. Cate, and M. A. Marletta. 2011. "Extracellular aldonolactonase from *Myceliophthora thermophila*." *Appl Environ Microbiol* no. 77 (2):650-6. doi: 10.1128/AEM.01922-10.
- Berghäll, S., S. Hilditch, M. Penttilä, and P. Richard. 2007. "Identification in the mould *Hypocrea jecorina* of a gene encoding an NADP(+): d-xylose dehydrogenase." *FEMS Microbiol Lett* no. 277 (2):249-53. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00969.x.
- Berka, R. M., I. V. Grigoriev, R. Otillar, A. Salamov, J. Grimwood, I. Reid, N. Ishmael, T. John, C. Darmond, M. C. Moisan, B. Henrissat, P. M. Coutinho, V. Lombard, D. O. Natvig, E. Lindquist, J. Schmutz, S. Lucas, P. Harris, J. Powlowski, A. Bellemare, D. Taylor, G. Butler, R. P. de Vries, I. E. Allijn, J. van den Brink, S. Ushinsky, R. Storms, A. J. Powell, I. T. Paulsen, L. D. Elbourne, S. E. Baker, J. Magnuson, S. Laboissiere, A. J. Clutterbuck, D. Martinez, M. Wogulis, A. L. de Leon, M. W. Rey, and A. Tsang. 2011. "Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*." *Nat Biotechnol* no. 29 (10):922-7. doi: 10.1038/nbt.1976.
- Bourdais, A., F. Bidard, D. Zickler, V. Berteaux-Lecellier, P. Silar, and E. Espagne. 2012. "Wood utilization is dependent on catalase activities in the filamentous fungus *Podospira anserina*." *PLoS One* no. 7 (4):e29820. doi: 10.1371/journal.pone.0029820.

- Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* no. 72:248-54.
- Cannella, D., C. W. C. Hsieh, C. Felby, and H. Jorgensen. 2012. "Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content." *Biotechnology for Biofuels* no. 5:10. doi: 10.1186/1754-6834-5-26.
- Cañas, A. I., and S. Camarero. 2010. "Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes." *Biotechnol Adv* no. 28 (6):694-705. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.002.
- Conchie, J., and G. A. Levvy. 1957. "Inhibition of glycosidases by aldonolactones of corresponding configuration." *Biochem J* no. 65 (2):389-95.
- Dale, Marsha P., Harry E. Ensley, Katherine Kern, K. A. R. Sastry, and Larry D. Byers. 1985. "Reversible inhibitors of beta-glucosidase." *Biochemistry* no. 24 (14):3530-3539.
- Dimarogona, M., E. Topakas, and P. Christakopoulos. 2013. "Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts." *Appl Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s00253-013-5197-y.
- Elwyn, T. Reese, Ralph G. Siu, and Hillel S. Levinson. 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. 59 (4): 485-497.
- Gusakov, Alexander V., and Arkady P. Sinitsyn. 2012. "Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass." *Biofuels* no. 3 (4):463-477. doi: 10.4155/bfs.12.41.
- Hallberg, B. M., G. Henriksson, G. Pettersson, and C. Divne. 2002. "Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase." *J Mol Biol* no. 315 (3):421-34. doi: 10.1006/jmbi.2001.5246.
- Harreither, W., C. Sygmund, M. Augustin, M. Narciso, M. L. Rabinovich, L. Gorton, D. Haltrich, and R. Ludwig. 2011. "Catalytic properties and classification of cellobiose dehydrogenases from ascomycetes." *Appl Environ Microbiol* no. 77 (5):1804-15. doi: 10.1128/AEM.02052-10.
- Harris, P. V., D. Welner, K. C. McFarland, E. Re, J. C. Navarro Poulsen, K. Brown, R. Salbo, H. Ding, E. Vlasenko, S. Merino, F. Xu, J. Cherry, S. Larsen, and L. Lo Leggio. 2010. "Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family." *Biochemistry* no. 49 (15):3305-16. doi: 10.1021/bi100009p.
- Henriksson, G., G. Johansson, and G. Pettersson. 2000. "A critical review of cellobiose dehydrogenases." *J Biotechnol* no. 78 (2):93-113.
- Horn, S. J., G. Vaaje-Kolstad, B. Westereng, and V. G. Eijsink. 2012. "Novel enzymes for the degradation of cellulose." *Biotechnol Biofuels* no. 5 (1):45. doi: 10.1186/1754-6834-5-45.
- Hoshino, E, M Shiroishi, Y Amano, M Nomura, and T Kanda. 1997. "Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities." *Journal of Fermentation and Bioengineering* no. 84 (4):300-306. doi: 10.1016/S0922-338X(97)89248-3.
- Ismail, W., and J. Gescher. 2012. "Epoxy Coenzyme A Thioester pathways for degradation of aromatic compounds." *Appl Environ Microbiol* no. 78 (15):5043-51. doi: 10.1128/AEM.00633-12.
- Jeoh, T, DB Wilson, and LP Walker. 2006. "Effect of cellulase mole fraction and cellulose recalcitrance on synergism in cellulose hydrolysis and binding." *Biotechnology Progress* no. 22 (1):270-277. doi: 10.1021/bp050266f.

- Jeoh, T., C. I. Ishizawa, M. F. Davis, M. E. Himmel, W. S. Adney, and D. K. Johnson. 2007. "Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility." *Biotechnol Bioeng* no. 98 (1):112-22. doi: 10.1002/bit.21408.
- Kostylev, Maxim, and David Wilson. 2012. "Synergistic interactions in cellulose hydrolysis." *Biofuels* no. 3 (1):61-70.
- Langston, J. A., T. Shaghasi, E. Abbate, F. Xu, E. Vlasenko, and M. D. Sweeney. 2011. "Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61." *Appl Environ Microbiol* no. 77 (19):7007-15. doi: 10.1128/AEM.05815-11.
- Levasseur, A., E. Drula, V. Lombard, P. M. Coutinho, and B. Henrissat. 2013. "Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes." *Biotechnol Biofuels* no. 6 (1):41. doi: 10.1186/1754-6834-6-41.
- Mandels, Mary, and James Weber. 1969. "The Production of Cellulases." In *Cellulases and Their Applications*, 391-414. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.
- Mansfield, S. D., E. De Jong, and J. N. Saddler. 1997. "Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization." *Appl Environ Microbiol* no. 63 (10):3804-9.
- Martin, C, GJD Rocha, JRA dos Santos, MCD Wanderley, and ER Gouveia. 2012. "ENZYME LOADING DEPENDENCE OF CELLULOSE HYDROLYSIS OF SUGARCANE BAGASSE." *Quimica Nova* no. 35 (10):1927-U61.
- Merheb-Dini, C., H. Cabral, R. S. Leite, L. M. Zanphorlin, D. N. Okamoto, G. O. Rodriguez, L. Juliano, E. C. Arantes, E. Gomes, and R. da Silva. 2009. "Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*." *J Agric Food Chem* no. 57 (19):9210-7. doi: 10.1021/jf9017977.
- Moretti, M. M., D. A. Bocchini-Martins, R. D. Silva, A. Rodrigues, L. D. Sette, and E. Gomes. 2012. "Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation." *Braz J Microbiol* no. 43 (3):1062-71. doi: 10.1590/S1517-838220120003000032.
- Nesvizhskii, A. I., A. Keller, E. Kolker, and R. Aebersold. 2003. "A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry." *Anal Chem* no. 75 (17):4646-58.
- Oberson, J., T. Binz, D. Fracheboud, and G. Canevascini. 1992. Comparative investigation of cellulose-degrading enzyme systems produced by different strains of *Myceliophthora thermophila* (Apinis) v. Oorschot. *Enzyme and Microbial Technology*
- Parry, N. J., D. E. Beever, E. Owen, I. Vandenberghe, J. Van Beeumen, and M. K. Bhat. 2001. "Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*." *Biochemical Journal* no. 353:117-127.
- Phillips, C. M., W. T. Beeson, J. H. Cate, and M. A. Marletta. 2011. "Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*." *ACS Chem Biol* no. 6 (12):1399-406. doi: 10.1021/cb200351y.
- Ribeiro, D.A., Junio Cota, Thabata M. Alvarez, Fernanda Br  chli, Juliano Bragato, Beatriz M. P. Pereira, Bianca A. Pauletti, George Jackson, T. B. Pimenta Maria, T. Murakami Mario, Camassola Marli, Ruller Roberto, J. P. Dillon Aldo, G. C. Pradella Jose, F. Paes Leme Adriana, and M. Squina Fabio. 2012. "The

- Penicillium echinulatum Secretome on Sugar Cane Bagasse." *PLoS ONE* no. 7 (12):1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0050571.
- Rocha, G. J. M., A. R. Gonçalves, B. R. Oliveira, E. G. Olivares, and C. E. V. Rossell. 2011. "Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production." *Industrial Crops and Products* no. 35 (1):274-279.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* no. 68 (5):850-8.
- Singhania, Reeta Rani, Rajeev K. Sukumaran, Anil Kumar Patel, Christian Larroche, and Ashok Pandey. 2010. "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases." *Enzyme and Microbial Technology* no. 46 (7):541-549. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>.
- Singhania, Reeta Rani, Rajeev Kumar Sukumaran, Kuni Parambil Rajasree, Abraham Mathew, Lalithadevi Gottumukkala, and Ashok Pandey. 2011. "Properties of a major β -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources." *Process Biochemistry* no. 46 (7):1521-1524. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.04.006>.
- Väljamäe, Priit, Veljo Sild, Anu Nutt, Göran Pettersson, and Gunnar Johansson. 1999. "Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I." *Eur. J. Biochem.* no. 266 (2):327-334. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00853.x.
- Weber, Klaus, and Mary Osborn. 1969. "The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Journal of Biological Chemistry* no. 244 (16):4406-4412.
- Whittaker, M. M., P. J. Kersten, N. Nakamura, J. Sanders-Loehr, E. S. Schweizer, and J. W. Whittaker. 1996. "Glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is a new radical-copper oxidase." *J Biol Chem* no. 271 (2):681-7.
- Zahoor, S., M. M. Javed, S. Aftab, F. Latif, and Ikram-ul-Haq. 2011. Metabolic engineering and thermodynamic characterization of an extracellular β -glucosidase produced by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*.

Figure captions

Figure 1:

Xylanases, β -glucosidases, FPase activities and total protein concentration from *M.thermophila* applying batch and fed-batch bioreactors on different carbon sources and experimental run conditions. A and B-SET, pH 5.0, 45°C. C-SET, pH 6.0, 45°C. D-SET, pH 6.0, 38-29°C. E-SET+saccharose, pH 6.0, 45°C. F-WB, pH 6.0, 45°C. Asterisks indicate the feeding pulse time.

Figure 2:

Piechart showing the distribution and classification of proteins found in the secretomes of *M. thermophila* corresponding to the CAZy database nomenclature, when cellulose (CEL), xylans (XIL), *in natura* (INSB) and pretreated sugar cane bagasses (DSET and SET) were used as growth media. Auxiliary activity families (AAs-dark blue), glycoside hydrolase families (GHs-red), cellobiohydrolases (CBMs-green), carbohydrate esterases (CEs-purple), non glycoside hydrolases (NON-GHs-blue), carbohydrate-binding modules (CBMs-orange), hypothetical proteins (HYPs-clear blue), endoglucanase (ENDOGLUs-pink) and polysaccharide lyases (PLs-clear green).

Figure 3:

Glucose, gluconic acid (A) and cellobiose, cellobionic acid (B) concentrations (g/L) measured after enzymatic hydrolysis of 5% (w/v) celufloc (EC), *in natura* (INSB) and pretreated sugar cane bagasses (DSET and SET) at 50°C, using the enzyme cocktail produced by *M. thermophila* on INSB growth media.

Tables and Figures

Table 1 Maximum enzymatic activity of *M. thermohila* enzymes in shaking flasks submerged fermentation for different substrates and their combinations (ratio of binary mixtures was 3:1, otherwise stated).

Substrate	FPase (FPU/mL) (h)	Xylanase (IU/mL) (h)	β -glucosidase (IU/mL) (h)	Protein Concentration (mg/mL) (h)
SET	0.23 $\pm$ 0.03 (48)	2.90 $\pm$ 0.06 (48)	0.43 $\pm$ 0.10 (72)	0.12 $\pm$ 0.01 (120)
DSET	0.10 $\pm$ 0.01 (48)	2.60 $\pm$ 0.20 (72)	0.33 $\pm$ 0.06 (96)	0.07 $\pm$ 0.01 (96)
WB	0.12 $\pm$ 0.02 (48)	2.00 $\pm$ 0.04 (24)	1.00 $\pm$ 0.04 (120)	0.15 $\pm$ 0.02 (120)
EC	0.10 $\pm$ 0.01 (48)	2.60 $\pm$ 0.14 (72)	0.33 $\pm$ 0.08 (96)	0.04 $\pm$ 0.01 (48)
SET + WB	0.10 $\pm$ 0.02 (72)	2.80 $\pm$ 0.05 (72)	0.55 $\pm$ 0.05 (72)	0.13 $\pm$ 0.02 (96)
SET + SM	0.13 $\pm$ 0.02 (72)	2.50 $\pm$ 0.10 (48)	0.53 $\pm$ 0.07 (120)	0.24 $\pm$ 0.03 (96)
DSET + SM	0.13 $\pm$ 0.03 (72)	2.80 $\pm$ 0.08 (72)	0.42 $\pm$ 0.05 (120)	0.10 $\pm$ 0.01 (120)
SET + FOS	-	3.50 $\pm$ 0.05 (48)	-	0.11 $\pm$ 0.01 (24)
SET + lactose 1:1	-	3.50 $\pm$ 0.10 (72)	-	0.08 $\pm$ 0.01 (24)
SET + lactose	0.19 $\pm$ 0.02 (72)	3.10 $\pm$ 0.08 (72)	0.57 $\pm$ 0.06 (120)	0.12 $\pm$ 0.01 (96)
SET + glycerol	0.18 $\pm$ 0.02 (96)	2.80 $\pm$ 0.05 (72)	0.46 $\pm$ 0.09 (120)	0.10 $\pm$ 0.02 (48)
SET + sucrose	0.18 $\pm$ 0.04 (96)	3.30 $\pm$ 0.12 (72)	0.43 $\pm$ 0.08 (120)	0.10 $\pm$ 0.01 (120)

Steam-exploded sugar cane bagasse (SET), delignified steam-exploded sugar cane bagasse (DSET), Celufloc 200™ (EC), wheat bran (WB), soybean mill (SM), glycerol, lactose, sucrose and commercial phosphofructooligosaccharide (FOS). The time maximum activity was observed is shown in parenthesis.

Table 2 The influence of different substrates and their combinations on maximum enzymatic activity of *M. thermophila* in bioreactor submerged cultivation.

Run number	Substrate / T(°C) / pH	Pulse (h)	FPase (FPU/mL) (h)	Xylanase (IU/mL) (h)	β-glucosidase (IU/mL) (h)	Protein (mg/mL) (h)
#1	SET / 45 / 5	96	0.10 ± 0.01 (72)	3.88 ± 0.12 (72)	0.37 ± 0.04 (120)	0.06 ± 0.02 (120)
#2	SET / 45 / 5	48 / 96	0.13 ± 0.03 (120)	1,93 ± 0.13-(96)	0.30 ± 0.06 (96)	0.08 ± 0.02 (96)
#3	SET / 45 / 6	48 / 96	0.10 ± 0.02 (96)	1.80 ± 0.03 (48)	0.48 ± 0.03 (120)	0.10 ± 0.04 (96)
#4	SET / 38-29/ 6	96	0.18 ± 0.03 (120)	2.00 ± 0.01(120)	0.44 ± 0.02 (96)	0.17 ± 0.01 (120)
#5	SET + sucrose / 45 / 6	---	0.21 ± 0.02 (24)	2.70 ± 0.07 (48)	0.72 ± 0.01 (120)	0.16 ± 0.05 (24)
#6	WB / 45 / 6	---	0.06 ± 0.01 (24)	2.88 ± 0.01 (24)	1.64 ± 0.10 (96)	0.13 ± 0.01 (24)

The time observed maximum activity is shown in parenthesis.

Figure 1

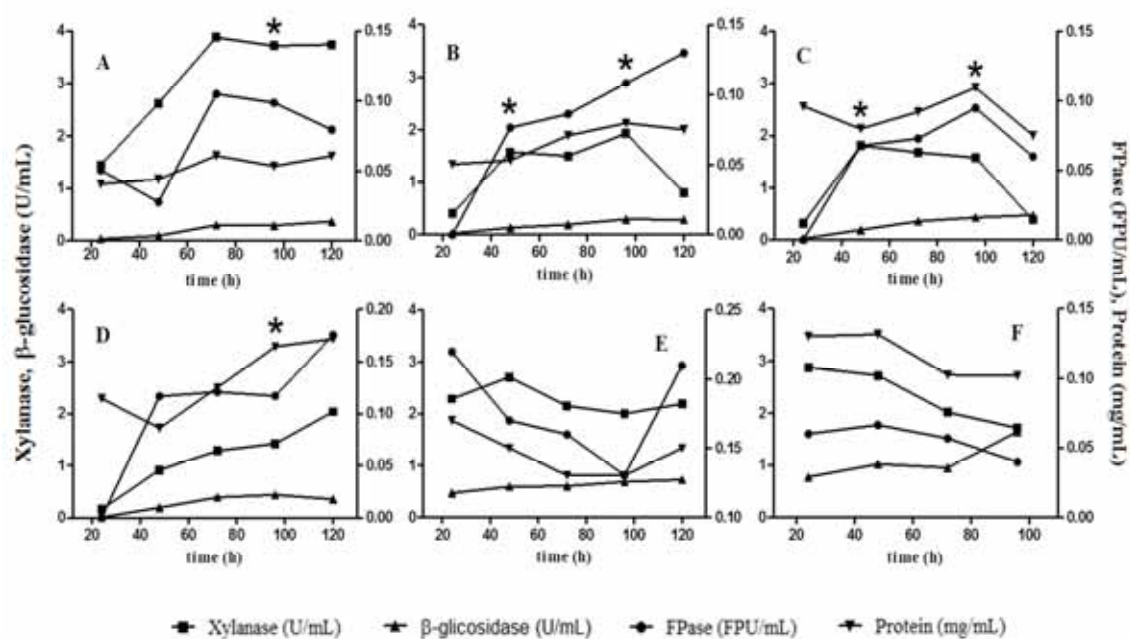


Figure 2

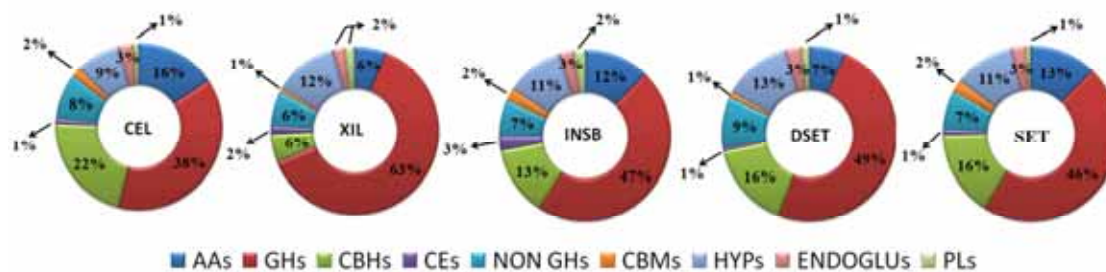
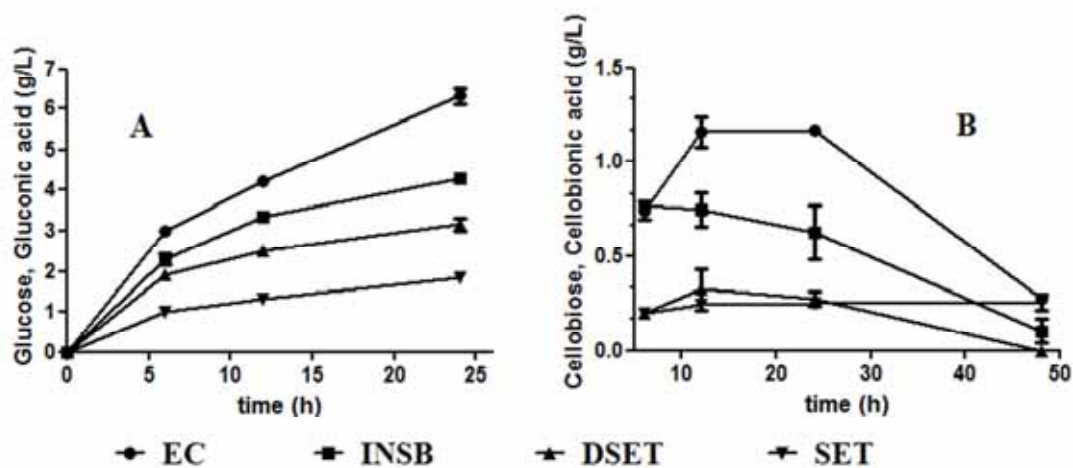


Figure 3



Tabelas Suplementares - Manuscrito I

Tabela S1

Table S1. Glycoside Hydrolases (CAZy enzymes) identified by LC/MS-MS from supernatants of *M. thermophila* grown on six different substrates (GLC, CEL, XYL, INSB, DSET and SET).

CAZy class	ACCESSION GI	MW (kDa)	Unique peptides					
			GLC	CEL	XYL	INSB	DSET	SET
GH31	347010772	97	24	30	54	39	26	44
GH81	347011396	91	22	21	38	30	33	30
GH7	347008056	56	19	31	24	27	26	33
GH7	347013780	49	18	27	17	26	26	27
GH7	347011876	49	12	25	14	22	21	24
GH7	347010710	49	10	14	11	15	15	16
GH7	347006034	49	0	0	0	0	2	0
GH43	347009817	61	17	23	31	27	27	23
GH43	347010818	49	7	13	20	16	15	13
GH43	347009205	67	9	13	26	20	10	21
GH43	347013594	37	2	3	6	11	0	14
GH43	347014190	55	8	16	9	14	15	14
GH43	347010937	35	2	4	12	7	5	4
GH43	347011434	39	2	3	10	7	0	0
GH3	347010857	78	21	24	29	26	31	32
GH3	347012994	84	2	13	22	18	9	11
GH3	347010689	95	11	20	24	22	24	23
GH3	347013048	90	3	2	9	7	6	8
GH55	347010723	84	23	22	25	18	26	25
GH55	347008205	95	3	11	10	9	11	11
GH55	347011592	82	8	13	18	14	13	16
GH55	347012862	82	0	6	0	3	7	3
GH38	347006480	123	28	38	70	24	51	58
GH18	347010813	46	9	16	21	17	17	17
GH18	347012251	45	14	15	29	26	10	26
GH2	347007020	66	12	22	24	22	23	24
GH2	347011950	96	0	0	0	2	0	0
GH74	347011442	79	13	25	18	24	26	30
GH20	347005947	65	10	15	24	19	19	18
GH15	347014101	67	11	15	20	14	20	18
GH16	347011420	41	11	13	15	14	14	16
GH30	347009128	53	4	12	15	14	13	16
GH71	347013742	67	5	12	16	12	14	14
GH47	347011389	58	8	18	26	17	18	20
GH92	347007534	90	9	8	19	14	19	15
GH6	347009703	41	8	22	7	14	2	7
GH6	347008300	51	8	15	5	11	11	14

GH6	347011795	42	0	0	0	0	0	3
GH1	347009973	54	5	10	2	13	7	14
GH17	347009838	43	8	9	15	12	18	10
GH26	347006182	53	8	16	10	11	8	13
GH13	347010961	58	3	5	16	11	7	11
GH95	347010011	91	2	2	17	10	0	5
GH10	347012973	45	6	10	9	10	8	11
GH10	347011113	42	2	8	7	7	0	0
GH72	347008543	49	10	7	6	13	14	9
GH72	347013570	50	2	0	0	5	0	6
GH72	347009194	57	4	8	0	6	6	10
GH72	347014483	52	2	5	0	2	2	11
GH93	347008004	42	6	6	11	9	7	7
GH93	347012961	46	2	0	4	7	0	0
GH62	347012329	35	4	7	9	8	5	8
GH62	347013451	40	0	0	0	2	0	0
GH61	347013774	26	2	3	2	4	0	2
GH61	347009055	35	5	8	4	6	5	7
GH61	347010683	32	0	8	0	3	0	0
GH61	347013822	24	0	3	0	3	0	0
GH61	347008929	31	2	2	0	2	0	0
GH61	347009178	27	2	4	0	0	4	4
GH61	347008529	26	2	4	0	0	2	0
GH11	347009670	29	0	0	2	4	3	3
GH11	347007024	24	2	2	3	3	2	2
GH11	347010798	25	0	0	3	2	0	0
GH11	347012902	16	0	0	0	2	0	0
GH75	347013426	33	0	3	4	5	0	6
GH5	347010970	37	3	7	6	2	7	3
GH5	347011035	47	2	2	14	5	3	0
GH5	347009915	47	0	0	0	3	0	0
GH16	347013280	31	3	4	6	4	5	6
GH16	347010669	24	4	6	4	4	7	5
GH16	347009778	48	0	0	0	0	0	3
GH12	347013049	27	3	2	3	3	3	2
GH51	347010967	58	0	0	0	2	0	0
GH79	347005644	40	0	4	2	0	0	0

GLC, glucose; CEL, avicel:carboxymethylcellulose (1:1); XYL, mix of xylans; INSB, *in natura* sugar cane bagasse; DSET, delignified steam exploded sugar cane bagasse; SET, steam exploded sugar cane bagasse.

Tabela S2

Table S2. CBM, CE and PL (CAZy enzymes) identified by LC/MS-MS from supernatants of *M. thermophila* grown on six different substrates (GLC, CEL, XIL, SCBIN, SCBSED and SCBSE).

CAZy class	ACCESSION GI	MW kDa	Unique peptides					
			GLC	CEL	XIL	SCBIN	SCBSED	SCBSE
carbohydrate-binding WSC domain protein	347013340	38	9	13	9	11	5	12
carbohydrate-binding module family 1 protein, partial	347012789	32	4	8	6	7	6	7
carbohydrate-binding module family 1 protein	347010721	46	0	2	0	8	4	10
carbohydrate-binding module family 1 protein	347014594	37	0	0	0	5	0	7
carbohydrate esterase family 8 protein	347013279	36	4	3	15	12	0	0
carbohydrate esterase family 3 protein	347013486	32	7	9	9	10	3	5
carbohydrate esterase family 1 protein	347013611	29	2	0	5	6	3	5
carbohydrate esterase family 16 protein	347012118	32	0	4	0	3	2	4
carbohydrate esterase family 1 protein	347010761	34	0	0	0	3	2	2
carbohydrate esterase family 1 protein	347014526	31	0	0	0	2	0	0
polysaccharide lyase family 1 protein	347011254	34	8	10	12	12	12	9
polysaccharide lyase family 20 protein	347011988	29	0	2	5	5	0	5
polysaccharide lyase family 1 protein	347007508	35	0	4	4	4	0	2
polysaccharide lyase family 4 protein	347011711	58	0	2	0	3	7	0
polysaccharide lyase family 3 protein	347011849	26	0	0	2	0	0	0

GLC, glucose; CEL, avicel:carboxymethylcellulose (1:1); XYL, xylan mix; SCBIN, sugar cane bagasse in natura; SCBDDL, sugar cane bagasse delignified; SCBSE, sugar cane bagasse steam exploded.

Tabela S3

Table S3. Auxiliary activities (CAZy enzymes) identified by LC/MS-MS from supernatants of *M. thermophile* grown on six different substrates (GLC, CEL, XYL, SCBIN, SCBSED and SCBSE).

CAZy class	ACCESSION GI	MW kDa	Unique peptides					
			GLC	CEL	XYL	SCBIN	SCBSED	SCBSE
AA3_1 cellobiosedehydrogenase	3319315	88	27	41	34	40	34	46
AA3_1 cellobiosedehydrogenase	347011813	84	17	27	9	15	11	22
AA3_1 cellobiosedehydrogenase	347013821	57	0	2	4	4	5	4
AA5_1 glyoxal oxidase like protein	347006010	105	6	17	16	16	12	18
AA3_2 GMC oxidoreductase-like protein	347008190	69	5	12	14	16	10	14
AA3_2 GMC oxidoreductase-like protein	347010915	69	0	5	0	7	0	9
AA3_2 GMC oxidoreductase-like protein	347011121	68	0	0	0	7	0	12
AA3_2 GMC oxidoreductase-like protein	347013781	71	0	0	0	5	0	0
AA_1 multicopper oxidase	347013702	72	2	4	7	6	2	5
AA1_3 laccase with copper binding domain	347007110	66	2	4	8	8	2	5
AA7 glucooligosaccharide oxidase	347011028	54	0	2	5	4	0	3
AA3_3 alcohol oxidase	347012985	65	0	2	0	4	0	0
AA9 lytic polysaccharide monooxygenase	347013774	26	2	3	2	4	0	2
AA9 lytic polysaccharide monooxygenase	347009055	35	5	8	4	6	5	7
AA9 lytic polysaccharide monooxygenase	347010683	32	0	8	0	3	0	0
AA9 lytic polysaccharide monooxygenase	347013822	24	0	3	0	3	0	0
AA9 lytic polysaccharide monooxygenase	347008929	31	2	2	0	2	0	0
AA9 lytic polysaccharide monooxygenase	347009178	27	2	4	0	0	4	4
AA9 lytic polysaccharide monooxygenase	347008529	26	2	4	0	0	2	0

GLC, glucose; CEL, avicel;carboxymethylcellulose (1:1); XYL, xylan mix; SCBIN, sugar cane bagasse in natura; SCBDL, sugar cane bagasse delignified; SCBSE, sugar cane bagasse steam.

Tabela S4

Table S4. Non Cazy class proteins identified by LC/MS-MS from supernatants of *M. thermophila* grown on six different substrates (GLC, CEL, XIL, SCBIN, SCBSED and SCBSE).

Non-CAZy class	ACCESSION GI	MW kDa	Unique peptides					
			GLC	CEL	XYL	SCBIN	SCBSED	SCBSE
aldose epimerase-like protein	347012126	41	12	22	20	18	23	22
catalase	347010301	78	24	19	24	25	33	27
pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase-like protein	347013124	45	10	16	21	17	20	22
extracellular aldonolactonase	313667052	43	5	11	8	9	12	11
necrosis inducing factor	347012790	33	2	3	8	9	4	10
asparaginase	347012213	41	2	3	5	5	6	5
carboxypeptidase	347009113	46	0	3	8	0	0	0
peptidase	347014627	54	0	8	2	6	0	0
tyrosinase-like protein	347013282	46	0	4	4	2	4	3
tyrosinase-like protein	347011242	37	3	7	0	0	0	0
peptidase-like protein	347012974	53	0	10	0	2	0	0
phospholipase C-like protein	347009837	67	0	0	0	6	0	0
NADP:D-xylose dehydrogenase	347014406	43	0	0	0	0	0	5
serine protease	347009682	40	0	0	2	0	2	0
Endonuclease/exonuclease/phosphatase-like protein	347008200	65	0	2	0	0	0	0
peptidase-like protein	347009020	67	0	2	0	0	0	0
Intradiol ring-cleavage dioxygenase-like protein	347013137	41	0	0	2	0	0	0

GLC, glucose; CEL, avicel:carboxymethylcellulose (1:1); XYL, xylan mix; SCBIN, sugar cane bagasse in natura; SCBDL, sugar cane bagasse delignified; SCBSE, sugar cane bagasse steam exploded.

Tabela S5

Table S5. Hypothetical proteins identified by LC/MS-MS from supernatants of *M. thermophila* grown on six different substrates (GLC, CEL, XIL, INSB, DSET and SET).

CAZy class	ACCESSION GI	MW (kDa)	Unique peptides					
			GLC	CEL	XYL	INSB	DSET	SET
hypothetical protein MYCTH_2307339	347011745	76	18	22	22	21	23	21
hypothetical protein MYCTH_2307666	347011921	55	10	13	14	12	14	13
hypothetical protein MYCTH_2294250	347005727	80	9	8	30	15	18	22
hypothetical protein MYCTH_2126295	347009809	52	5	8	12	13	9	13
hypothetical protein MYCTH_2299856	347008243	42	5	10	10	9	13	11
hypothetical protein MYCTH_2304549	347010366	66	2	6	25	14	9	12
hypothetical protein MYCTH_2295992	347006501	98	7	8	5	10	12	12
hypothetical protein MYCTH_2299664	347008141	49	9	7	0	0	15	15
hypothetical protein MYCTH_2301831	347009183	33	5	2	4	4	6	9
hypothetical protein MYCTH_2306121	347011160	32	0	6	6	3	5	2
hypothetical protein MYCTH_2299483	347008045	69	0	0	7	3	5	4
hypothetical protein MYCTH_75329	347013738	20	0	0	3	4	4	3
hypothetical protein MYCTH_64095	347007100	105	0	0	28	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2311254	347013779	22	3	2	3	2	3	2
hypothetical protein MYCTH_2084531	347013999	55	0	2	0	0	8	8
hypothetical protein MYCTH_2297816	347007306	16	3	5	6	7	0	0
hypothetical protein MYCTH_2309042	347012661	75	3	0	7	5	4	3
hypothetical protein MYCTH_2296038	347006517	30	0	0	3	0	0	2
hypothetical protein MYCTH_2303093	347009730	62	0	2	3	3	2	4
hypothetical protein MYCTH_2308135	347012190	104	0	0	5	0	2	8
hypothetical protein MYCTH_102138	347009818	20	3	2	2	3	0	0
hypothetical protein MYCTH_2306107	347011151	52	3	3	2	3	3	4
hypothetical protein MYCTH_80274	347010715	89	0	9	7	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2311687	347014008	26	0	3	3	2	0	2
hypothetical protein MYCTH_2306748	347011470	54	0	3	0	0	5	0
hypothetical protein MYCTH_2302321	347009397	63	2	2	3	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2295704	347006346	32	0	2	0	0	3	2
hypothetical protein MYCTH_2303108	347009733	42	4	3	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2300931	347008746	110	0	0	2	2	0	3
hypothetical protein MYCTH_2303940	347010116	51	0	0	4	2	0	2
hypothetical protein MYCTH_2301051	347008807	17	0	3	0	0	0	2
hypothetical protein MYCTH_2297119	347007001	63	0	4	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2307988	347012092	27	0	0	0	2	2	2
hypothetical protein MYCTH_2294543	347005867	274	0	0	2	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2302105	347009307	79	0	0	2	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2301054	347008809	32	0	0	0	0	3	2
hypothetical protein MYCTH_2297118	347007000	23	2	2	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2119688	347011992	111	0	0	0	0	2	0
hypothetical protein MYCTH_2297460	347007172	38	2	2	2	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2122605	347006248	42	0	0	0	2	0	4
hypothetical protein MYCTH_2308073	347012133	39	0	0	0	0	2	0
hypothetical protein MYCTH_2304102	347010181	38	0	0	3	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2295898	347006457	80	0	0	0	0	0	2
hypothetical protein MYCTH_100838	347008750	34	0	0	0	2	0	2
hypothetical protein MYCTH_2302336	347009400	65	0	0	0	2	0	3
hypothetical protein MYCTH_2296814	347006852	60	0	0	3	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2069574	347013197	36	0	0	0	0	0	2
hypothetical protein MYCTH_2305453	347010766	64	0	2	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2296558	347006733	160	0	0	2	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2310556	347013386	82	2	0	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2086155	347007575	85	2	0	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2310678	347013446	45	0	3	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_73480	347008058	26	2	0	0	0	0	0

hypothetical protein MYCTH_2140820	347013943	54	2	0	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2312159	347014232	453	0	0	2	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_57777	347013887	33	0	0	2	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2310812	347013553	52	0	0	0	0	2	0
hypothetical protein MYCTH_2312882	347014522	34	2	0	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2049780	347006690	176	0	2	0	0	0	0
hypothetical protein MYCTH_2311910	347014116	50	0	0	0	0	2	0

GLC, glucose; CEL, avicel:carboxymethylcellulose (1:1); XYL, mix of xylans; INSB, *in natura* sugar cane bagasse; DSET, delignified steam exploded sugar cane bagasse; SET, steam exploded sugar cane bagasse.

Tabela S6

Top 30 proteins identified by LC/MS-MS from supernatants of *M. thermophila* grown on six different substrates

TOP	Protein name	ACCESSION GI	MW kDa	SCBIN			SCBDL			SCBSE			GLC	
				TSC	-G	N	TSC	-G	N	TSC	-G	N	TSC	N
1	AA3 cellobiose dehydrogenase	3319315	88	238	179	76	110	51	26	287	228	88	98	59
2	GH7 cellobiohydrolase	347008056	56	210	154	66	214	158	79	263	207	80	93	56
3	GH7 cellobiohydrolase	347013780	49	120	86	37	165	131	66	157	123	47	56	34
4	GH81 endo-1,3-beta-glucanase	347011396	91	109	86	36	124	101	50	106	83	32	39	23
5	GH74 xyloglucanase	347011442	79	87	75	32	87	75	38	116	104	40	20	12
6	glycoside hydrolase GH55	347011592	82	102	74	32	101	73	37	112	84	32	46	28
7	GH31 alpha-xylosidase	347010772	97	97	69	30	59	31	16	118	90	35	46	28
8	GH7 cellobiohydrolase	347011876	49	89	69	29	84	64	32	111	91	35	34	20
9	GH43 beta-xylosidase	347009817	61	88	63	27	87	62	31	76	51	20	41	25
10	GH3 beta-glucosidase	347010857	78	103	62	26	141	100	50	115	74	29	68	41
11	GH18 chitinase	347012251	45	75	59	25	24	8	4	57	41	16	27	16
12	hypothetical protein MYCTH_2307339	347011745	76	87	56	24	115	84	42	109	78	30	51	31
13	polysaccharide lyase PL1	347011254	34	68	54	23	44	30	15	29	15	6	24	14
14	GH2 galactosidase	347007020	66	64	52	22	68	56	28	75	63	24	20	12
15	GH3 beta-glucosidase	347010689	95	60	51	22	74	65	33	60	51	20	15	9
16	GH30 endo-beta-1,6-galactanase	347009128	53	57	49	21	40	32	16	53	45	17	13	8
17	GMC oxidoreductase	347008190	69	53	49	21	28	24	12	36	32	12	7	4
18	GH47 alpha mannosidase	347011389	58	55	48	21	58	51	26	55	48	19	11	7
19	GH7 cellobiohydrolase	347010710	49	57	43	18	88	74	37	94	80	31	24	14
20	GH43 xylosidase arabinosidase	347009205	67	49	42	18	17	10	5	32	25	10	12	7
21	GH20 acetylhexosaminidases	347005947	65	55	41	18	61	47	24	53	39	15	23	14
22	GH31 alpha glucosidase Aqa2	387165376	46	55	41	18	42	28	14	30	16	6	23	14
23	glycoside hydrolase GH43	347014190	55	53	41	17	47	35	18	36	24	9	20	12
24	aldose epimerase	347012126	41	55	41	17	99	85	42	76	62	24	24	14
25	glycoside hydrolase GH18	347010813	46	49	40	17	41	32	16	58	49	19	15	9
26	catalase	347010301	78	71	40	17	90	59	30	72	41	16	52	31
27	hypothetical protein MYCTH_2126295	347009809	52	41	38	16	27	24	12	54	51	20	5	3
28	glyoxal oxidase like	347006010	105	45	37	16	29	21	10	50	42	16	14	8
29	GH26 beta mannanase	347006182	53	46	36	15	31	21	10	55	45	17	17	10
30	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	347013124	45	43	36	15	63	56	28	59	52	20	12	7

SCBIN, sugar cane bagasse in natura; SCBDL, sugar cane bagasse delignified; SCBSE, sugar cane bagasse steam exploded
TSC, total spectrum count; -G, TSC glucose discounted; N, normalized TSC *1000

TOP	Protein name	ACCESSION GI	MW kDa	CEL			GLC
				TSC	-G	N	TSC
1	GH7 cellobiohydrolase	347008056	56	281	188	107	93
2	GH7 cellobiohydrolase	347013780	49	200	144	82	56
3	AA3 cellobiose dehydrogenase	3319315	88	229	131	74	98
4	GH7 cellobiohydrolase	347011876	49	107	73	41	34
5	glycoside hydrolase GH6	347008300	51	80	60	34	20
6	cellobiose dehydrogenase	347011813	84	105	59	33	46
7	GH26 beta mannanase	347006182	53	66	49	28	17
8	aldose epimerase	347012126	41	71	47	27	24
9	GH74 xyloglucanase	347011442	79	63	43	24	20
10	glycoside hydrolase GH6	347009703	41	62	43	24	19
11	glyoxal oxidase like	347006010	105	53	39	22	14
12	glycoside hydrolase GH3	347010689	95	50	35	20	15
13	GH2 galactosidase	347007020	66	54	34	19	20
14	extracellular aldonolactonase	313667052	43	43	32	18	11
15	GH7 cellobiohydrolase	347010710	49	53	29	16	24
16	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	347013124	45	39	27	15	12
17	glycoside hydrolase GH38	347006480	123	78	26	15	52
18	endo-1,4-beta-glucanase precursor	343409229	42	36	26	15	10
19	hypothetical protein MYCTH_2307339	347011745	76	76	25	14	51
20	glycoside hydrolase GH114	347012343	39	28	24	14	4
21	glycoside hydrolase GH37	347005659	78	36	24	14	12
22	glycoside hydrolase GH10	347012973	45	37	22	12	15
23	peptidase	347014627	54	22	22	12	
24	glycoside hydrolase GH43	347014190	55	42	22	12	20
25	GH47 alpha mannosidase	347011389	58	32	21	12	11
26	glycoside hydrolase GH71	347013742	67	28	21	12	7
27	GMC oxidoreductase	347008190	69	28	21	12	7
28	glycoside hydrolase GH16	347011420	41	40	21	12	19
29	glycoside hydrolase GH18	347010813	46	35	20	11	15
30	GH30 endo-beta-1,6-galactanase	347009128	53	33	20	11	13

CEL , avicel:carboxymethylcellulose 1:1;

TSC, total spectrum count; -G, TSC glucose discounted; N, normalized TSC *1000

TOP	Protein name	ACCESSION GI	MW kDa	XYL			GLC
				TSC	-G	N	TSC
1	GH38 α -mannosidase	347006480	123	277	225	74	52
2	GH43 beta-xylosidase	347009817	61	225	184	60	41
3	GH31 alpha-xylosidase	347010772	97	195	149	49	46
4	GH81 endo-1,3-beta-glucanase	347011396	91	169	130	43	39
5	glycoside hydrolase GH55	347011592	82	157	111	36	46
6	GH31 alpha glucosidase Aga2	387165376	46	115	92	30	23
7	GH47 alpha mannosidase	347011389	58	100	89	29	11
8	GH3 beta-glucosidase	347010689	95	97	82	27	15
9	GH20 acetylhexosaminidases	347005947	65	104	81	27	23
11	glycoside hydrolase GH43	347009205	67	87	72	24	15
10	glycoside hydrolase GH18	347010813	46	84	72	24	12
12	GH2 galactosidase	347007020	66	91	71	23	20
14	hypothetical protein MYCTH_2304549	347010366	66	119	68	22	51
13	hypothetical protein MYCTH_2307339	347011745	76	71	68	22	3
15	GH18 chitinase	347012251	45	90	63	21	27
16	hypothetical protein MYCTH_2294250	347005727	80	78	62	20	16
17	GH30 endo-beta-1,6-galactanase	347009128	53	68	55	18	13
18	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	347013124	45	66	54	18	12
19	polysaccharide lyase PL1	347011254	34	73	49	16	24
22	glycoside hydrolase GH92	347007534	90	90	48	16	42
21	glycoside hydrolase GH95	347010011	91	51	48	16	3
20	glycoside hydrolase GH15	347014101	67	68	48	16	20
24	glycoside hydrolase GH13	347010961	58	53	46	15	7
23	GH71 α -1,3-glucanase	347013742	67	51	46	15	5
25	hypothetical protein MYCTH_2126295	347009809	52	47	42	14	5
27	carbohydrate esterase CE8	347013279	36	109	41	13	68
26	glycoside hydrolase GH3	347010857	78	49	41	13	8
28	hypothetical protein MYCTH_64095	347007100	105	40	40	13	
29	glycoside hydrolase GH43	347010818	49	51	39	13	12
30	aldose epimerase	347012126	41	62	38	12	24

XYL, xylan mix

TSC, total spectrum count; -G, TSC glucose discounted; N, normalized TSC *1000

Manuscrito II

Proteomic analysis of *Myceliophthora thermophila* M.7.7. grown on wheat bran; purification, biochemical properties and kinetics studies of a thermostable Glycoside Hydrolase family 3

Hévila Brognaro dos Santos^a, Junio Cota^b, Eleni Gomes^c, José G. C. Pradella^b, Roberto Ruller^b, Raghuvir K. Arni^a

^aLaboratório Estrutural e de Biologia Molecular, Departamento de Física, UNESP, ^bBrazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, Bairro Guarará, Campinas-SP/Brazil. ^cLaboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada, Departamento de Biologia, UNESP, Rua Cristovão Colombo, 2265, Jd. Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto-SP/Brazil;

Abstract

Myceliophthora thermophila M.7.7. was grown on wheat bran for 4 days. The crude extract was analysed by mass spectroscopy 59 proteins were identified. Among the matches a GH3 β -glucosidase (95 kDa e pI 4.5) was identified and purified and its biochemical and kinetics properties were evaluated. The purified GH3 named MTbgl3b was able to mainly hydrolyze cellobiose, 4 and 2- β -NPglucopyranoside and short chain saccharides as laminarin, lichenan and β -glucan. Ethanol and methanol decreased the GH3 activity on p- β -NPglucopyranoside even at 5% (v/v). The K_m results indicate that the pure MTbgl3b and the β -glucosidases in the crude enzymatic extract have greater affinity toward p- β -NPG (0.46mM) and cellobiose (0.52 mM), respectively. However the maximum specific activity (V_{max}) to the pure MTbgl3b on cellobiose was 2-fold higher than the crude extract on cellobiose and MTbgl3b on p- β -NPG. Optimal temperature and pH for the p- β -NPglucopyranoside hydrolysis were 5.0 and 50 °C and the half life of 16 days in these conditions. MTbgl3b is also faster and less inhibited by D-glucose than β -glucosidase from *A. niger* generally used as supplemental cocktail in

enzymatic hydrolysis. Thereby the enzyme is suitable for application in cocktails for biomass saccharification process.

1. Introdução

The deconstruction of lignocellulosic biomass, is an important natural recycling process of plant materials. Due to the large amount of biomass, which is generated from industrial and agricultural waste, this subject is to date the main focus of various investigations to improve biotechnological applications such as alternative fuels like lignocellulosic bioethanol taking the place of fossil fuel. In the procedure the biomass can be hydrolyzed enzymatically to produce glucose which can be converted to liquid fuel (Singhania et al. 2013), however the cost of efficient cellulase cocktails still remain the bottleneck to the economical production of these second generation biofuel (Phillips et al. 2011), which the enzymatic conversion of lignocellulose into sugars is a slow, expensive process and largely because cellulose is an insoluble crystalline substance (Himmel and Bayer 2009, Regalbuto 2009, 2011).

The classical enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose involves three types of cellulases, (i) cellobiohydrolases, (ii) endoglucanases and (iii) β -glucosidases working in synergy, which the last step is a catalysis reaction involving the action of β -glucosidase on cellobiose, inhibitor agent of cellobiohydrolases and endoglucanases. Thereby β -glucosidases works reducing the cellobiose inhibitor effect on the cellulases synergy mechanism releasing glucose as final product (Chauve et al. 2010). In addition, the produced glucose also inhibits cellulolysis, although to a lesser extent (Dekker 1986).

Currently, the filamentous fungus *Trichoderma reesei* remains as the predominant microorganism used by industry for production of cellulose-degrading enzymes, however this fungus produce insufficient β -glucosidases and the very low level lead to cellobiose accumulates. Many studies have been improved the hydrolysis

efficiency for supplementing of the native *T. reesei* enzymatic cocktail with extra β -glucosidase from other sources or by over expressing β -glucosidase in *T. reesei* (Pallapolu et al. 2011, Kumar, Singh, and Singh 2008b, Kumar, Singh, and Singh 2008a). The most common commercial β -glucosidase preparation (Novozymes SP188; Novo Nodisk A/S, Bagsvaerd, Danmark) used to supply sufficient activity is produced by *Aspergillus niger* (Chauve et al. 2010, Krogh et al. 2010). Other filamentous fungi, as *P. brasilianum*, *P. italicum*, *Aspergillus terreus*, *C. subvermispora*, *T. auranticus*, *P. cryosporium* (Park et al. 2012, Krogh et al. 2010, Nazir et al. 2009, Magalhães, Ferraz, and Milagres 2006, Parry et al. 2001, Lyman, Li, and Renganathan 1995) have been studied to find more efficient mixtures of cellulose-degrading enzymes than *T. reesei* and *A. niger*, whereas the desire is also increase the temperature of cellulose saccharification in order to increase reaction rates and minimize microbial contamination

Therefore the thermophilic and thermotolerant fungus *Myceliophthora thermophila* (Moretti et al. 2012) secretome profile, produced on wheat bran as carbon source, was assessed by mass spectroscopy and the β -glucosidase identified was purified and had its physico-chemical and kinetic properties analysed. The thermostability of the crude extract and the pure β -glucosidase at different temperatures and pH values, specificity against poly-, disaccharides and artificial substrates, kinetic parameters applying Michaelis-Menten (MM) constants using both p- β -NPG and cellobiose as substrates and inhibition of the hydrolysis of p- β -NPG by D-glucose were investigated to better characterize and understand the interactions between enzyme and substrate for modeling optimized cellulose enzymatic process for future industrial application of the enzyme in a biofuel production, mainly evaluating effects of cellobiose, glucose and temperature.

2. Material and Methods

2.1. Microorganism and inocula preparation

Myceliophthora thermophila was grown on solid agar petri dishes in Mandels and Weber culture media (1969) at 45°C for 7 days. The plates were scraped with platinum loop and the material was suspended in Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA) aqueous solution (0.1% w/v) and added to inoculum culture media containing (in w/v%) wheat bran (WB), 1.0%; glucose, 1.0%, peptone, 0.1% and Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA), 0.1%. The inoculum was incubated at 45°C, 250 rpm for 72h.

2.2. Bioreactor experiments

Fermentations assays were performed in lab scale bioreactors (Bioflo ® 115, NBS, USA) with a working volume of 1.5 L, using WB as carbon and inductor source. The inoculum rate was 10% of the working volume. Other components of culture media were used according to Mandels and Sternberg (1969). Fermentations were conducted by batch, the dissolved O₂ concentration was > 30% of air saturation and mechanical stirring was performed with two Rushton type impeller, in the range of 200 to 400 rpm. Prior to use all equipment was sterilized for 30 minutes at 121°C. Automatic pH control was done using a 0.4 M HCl and NH₄OH aqueous solution 3:1 (v/v) and the parameter was kept at 6.0. Foaming was controlled as required by manual addition of sterile antifoam polypropylene glycol 2000 (Dow Chemical, SP, Brazil). Assays were done up to 120 h and the samples were withdrawn under sterile conditions daily, centrifuged at 12.000 rpm for 25 minutes at 4°C and supernatant was collected for β -glucosidase and protein analysis.

2.3. Purification of β -glucosidase

The WB mycelia-free cultured media was collected, centrifuged and concentrated by hollow fiber system cartridge 10 kDa cut off millipore membrane

(Millipore, USA) along the buffer exchange to Tris-HCl 50 mM pH 8.0. The sample was loaded (1 mL/min) onto anionic exchanger Resource Q column previously equilibrated at pH 8.0 and the elution was carried out with the same buffer plus NaCl 1 M. The positive fractions for β -glucosidase activity were pooled and concentrated using the same buffer containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 M, and applied onto phenyl sepharose hydrophobic interaction column (HIC) equilibrated with the same buffer. The elution was done at 50% and 0% of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, which two peaks fractions were obtained. The β -glucosidase activity peak was concentrated and applied onto sephadex G-75, obtaining one unique peak. All steps were evaluated for non denaturing PAGE (Weber and Osborn 1969) and zymogram eletrophoresis. All liquid chromatography was done applying AKTA purifier upc 10 system, chemicals and columns from GE healthcare. The pure β -glucosidase was named MTbgl3b.

2.4. Standard assay and enzyme characterization

The standard enzymatic assay for β -glucosidase (BGL) evaluation was performed at optimal pH in appropriate acetate buffer and optimal temperature using 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p- β -NPG) 1 mM as substrate. The reaction was stopped by addition of 100 μL of Na_2CO_3 1 M and the releasing of p-nitrophenol was monitored colorimetrically at 400 nm (Gallifuoco et al. 1998) using Infinite® 200 PRO microplate reader (TECAN). All the assays were carried out employing the automated pipetting system epMotion® 5075 (Eppendorf). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that released p-nitrophenol or reducing sugars (in case of di-, polysaccharides or cellulosic substrates) at rate of 1 μmol per minute under standard conditions. Reducing sugars standard measure were determined using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method and monitored colorimetrically at 540 nm (Miller 1959). The optimal pH and temperature simple curves were carried out applying pH and

temperature ranges from 2.0 to 10 and from 30 to 80°C, respectively. Standard BGL assay was performed to the temperature effect applying the temperature range mentioned before and the pH effect was evaluated by measuring the activity on p- β -NPG after incubation in McIlvaine-glycine added buffer applying also the pH range above.

In order to evaluate thermal stability the crude enzymatic extract from WB and the BGL purified were incubated at 50, 60, 70 and 80°C applying the pH 5.0 and pH 7.4. Aliquots were taken at different incubation times and kept on ice until the evaluation of remaining enzymatic activity. The residual activities were performed in standard assay and the MTbgl3b half-life ($t_{1/2}$) was estimated using a mathematical approach previously described (Aguar-Oliveira and Maugeri 2011).

The MTbgl3b substrate specificity was evaluated using standard assays, modifications were specified. Ten different p-nitrophenol derived substrates, polyssacharides (purchased from the best source possible, Sigma Aldrich and Megazyme) were assayed in 60 minutes reaction and cellulosic substrates assayed in 14 hours reaction. The polysaccharides and cellulosic substrates hydrolysis were measured by DNS method (Miller 1959) and cellobiose and lactose substrates by glucose oxidase/peroxidase commercial kit method. The effects of several ions at the final concentration of 10 mM and chaotropic chemical compounds were evaluated under standard assay. The kinetic parameters for crude extract and MTbgl3b were estimated at twelve p- β -NPG concentrations ranging from 0.05 to 8 mM and at ten cellobiose concentrations ranging from 0.25 to 6 mM. Glucose was the inhibitor substrate, the inhibition assay was performed only with p- β -NPG applying glucose concentrations ranging up to 40 mM. The kinetic constants were assessed using the Michaelis-Menten approach and calculated by least square fitting of the kinetic model using GraphPad Prism version 5.00 (USA).

2.5. Assessment of crude enzymatic extract on hydrolysis of disaccharides, polysaccharides and artificial substrates

The cellulosic polysaccharides (avicel, cellulose microcrystalline, carboxymethylcellulose, sugar beet), hemicellulosic (xyloglucan, debranched arabinan, galacto mannan, arabinan, arabinogalactan, 1,4- β -D-mannan, beech wood and birch wood xylan), β -glucans (laminarin, lichenan), pectin and artificial substrates (pNP- β -D-cellobiose, pNP- β -D-glucopyranoside) were applied to assess the crude extract specificity. The polysaccharides and artificial substrates concentration were 5% and 1 mM, respectively and the reducing sugars and pNP activities were determined using the standard assays as described in section 2.4.

2.6. Protein separation by two dimensional gel electrophoresis (2-DE)

One hundred μ g of supernatant from WB was loaded on immobiline drystrip (pH 3-10, GE Healthcare) rehydrated overnight at room temperature. Isoelectric focusing (IEF) was performed with a Multiphor II system (GE Healthcare) at 20°C with a 3-phase gradient program: 500 V for 0.25 kVh, 3500 V for 5.25 kVh, and 3500 V for 28 kVh. Following IEF, the strip was equilibrated for 12 min in 10 mL of SDS equilibration buffer (Tris-HCl 50 mM, urea 6 M, glycerol 30% (v/v), SDS 2% (w/v), bromophenol blue 0.002%) and dithiothreitol 1% (w/v). A second equilibration step was performed with 2.5% (w/v) iodoacetamide added to the SDS equilibration buffer. The strip was then loaded onto 12.5% homogeneous ExcelGels (GE Healthcare). The second dimension of the separation was performed using the Multiphor II system operating at 15°C and with the following 2-phase gradient program: 120 V for 0.5 h and 600 V for 1 h. The gel was stained with SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

2.7 Sequence analysis and identification by mass spectroscopy

The samples were concentrated by ultrafiltration (10 kDa cut off) to 100 µg of total protein and applied on a SDS 12% polyacrylamide gel (1-DE). The protein bands were cut out of the gel, overnight digested with 5 ng of trypsin/µL (modified trypsin, Promega) in NH_4HCO_3 50 mM at 37°C and repeatedly extracted with 50% acetonitrile and 5% formic acid solution. The combined extracts were analysed by nano-electrospray mass spectrometry in a QTOF II instrument (Micromass, Manchester). The MS/MS spectra obtained by collision-induced fragmentation of the peptides were evaluated using MASCOT Ions Search software (Matrix Science, UK). The peptides with a minimum of 6 amino acid residues that showed significant threshold ($p < 0.05$) were considered in the Mascot results. The obtained data were analysed for homology searches in the SwissProt and NCBI data bank considering false discovery ratio (FDR) $< 5\%$.

3. Results and discussion

3.1 Assessment of proteomic profile from *Myceliophthora thermophila* M.7.7 grown on wheat bran

The wheat bran carbon source up regulated, as expected, a considerable number of proteins related to the degradation of lignocellulosic biomass. The mass spectroscopy analysis strategy identified in the crude cultured media 28 glycoside hydrolases (GHs), which GH10, GH11 and GH18 shown isoenzyme forms. Therefore the GHs Cazy class was the most identified proteins in the wheat bran secretome. Pectate and pectin lyase protein matches were also identified and belong to polysaccharide lyase family 1 Cazy class (PL1). Matches of carboxylesterase (CE1), acetyesterase (CE16) and auxiliary activities (AA) class (AA3, AA5_1, AA1_3 and AA9) were also identified. Carbohydrate binding module family 1 which is a modular structure, no-catalytic and appended to the enzymes, applied to the adhesion to carbohydrates was also identified.

The total number of peptides matched, classification, Mascot score, molecular mass and pI and % coverage are describe in Table 1. Proteins matches non belonged to Cazy database serine protease, catalase, aldo epimerase, peptidase, carboxypeptidase, fasciclin domain protein and fifteen hypothetical proteins were also identified (Table 1). The 2-DE gel eletrophoresis shown that the WB secretome has the most abundant enzymes between 40 and 140 kDa and isolectric point between 3.5 and 8.0 (Fig. 1A).

To evaluate the specificity of the enzymatic repertoire in WB secretome, biochemical performance were assessed in a set of artificial substrates and natural polysaccharides (linear and branched), totaling 21 different types of substrates. The crude secretome was able to hydrolyze all glucose polysaccharides containing, including avicel, CMC, sigma cell and cellulose microcrystalline aldrich (β -1-4 linked D-glucose), lichenan (β -1-4-and β 1-3 linked D-glucose), laminarin (β -1-3 and β -1-6 linked D-glucose) and β -glucan (β -1-3 and β -1-4 linked D-glucose), hydrolyzing also among the artificial substrates p-NP- β -D-cellobiose and p-NP- β -D-glucopyranoside. The fungus secretome also hydrolyzed hemicelluloses including birch and beech wood xylan, xyloglucan, mannan and pectin (Fig. 1B). Thereby the proteins assigned in proteomic analysis are in agreement with the biochemical analysis by the β -glucosidase (GH3), endo- β -1,4-glucanase (GH5), cellobiohydrolases (GH6 and GH7), laminarinase like (GH16), β -1,3-glucanases (GH55 and GH81) proteins matches identificados, responsible for cleavage of D-glucose linkage. Moreover cellobiose dehydrogenase (AA3_1) and auxiliary activity familiy 9 (AA9 previosly classified as GH61), both classified in the new enzymatic oxidative system, also can act on glucan polymers disrupting the β -1-4 and β -1-6 linked D-glucose (Phillips et al. 2011). The main and side hemicellulose chains hydrolysis was indicated by endo- β -1,4(3)-xylanases (GH10 and GH11), β -xylosidase (GH43), β -mannosidases (GH2), galactosidases (GH27), xylanases and glucanases

(GH30 and GH74), identified by the mass spectroscopy and specific activities on WB secretome.

Biochemical analysis were not made to polymers with α -configuration at the anomeric carbon, however glucoamylase (GH15), α -xylosidase (GH31), α -trehalase (GH37), α -mannosidase (GH38 and 47), α -L-arabinofuranosidase (GH51) protein matches were identified. The PLs family 1, CE family 1 and family 16 protein matches indicated the pectin hydrolysis. Chitinase (GH18) and β -N-acetylhexosaminidases (GH20) were also identified, however no one specific substrate was applied to the biochemical analysis.

3.2 Purification and identification of B-glucosidase via peptide sequence analysis

Myceliophthora thermophila was led in batch bioreactor with wheat bran 1% at 45°C for 5 days, producing 1 U·mL⁻¹ of β -glucosidase activity. The wheat bran was chosen among different carbon sources after previous assays for be the best β -glucosidase production (data not show). The pure β -glucosidase (namely MTbgl3b) was isolated using three chromatographics steps, (I) anionic exchange, (II) hydrophobic interaction and (III) molecular exclusion, which HIC was the most important step for increase the purification factor (10.53) at 50% of (NH₄)₂SO₄ 1.5 M, clearly observed in the agarose gel (Fig. 2). The homogeneity was confirmed by non denaturing PAGE eletrophoresis, which showed a single protein band around 97 kDa only after sephadex G-75, coincident with β -glucosidase band activity detected using esculin and ferric chloride. The data of enzyme purification procedure are summarized in Table 2. The MTbgl3b was purified 8,77 fold to homogeneity with an overall enzyme yield of 1,89% and a specific activity of 104,89 U·mg⁻¹.

To accurately identify the purified protein band, after the digestion using trypsin and LC-MS/MS procedure, the amino acid sequences of the peptides were

submitted to the BLAST that attributed the fragments to the sequence of glycoside hydrolase family 3 (GH3 accession number 367028272) protein from *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 as deposited to the NCBI non-redundant proteins database (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/blast), showing 97% of identity. The pI and molecular weight were theoretical estimated showing 5.08 and 95.0 kDa, respectively.

3.3 Effect of pH and temperature of the β -glucosidase applying the crude extract and the purified enzyme.

The MTbgl3b activity increased progressively reaching maximal activity at 60°C, the crude extract showed similar profile however the maximal activity was at 65°C. Both pure enzyme and crude extract decreased sharply when the temperature increased above 70°C, reaching a residual activity lower than 23% at 80°C (Fig. 3A). The optimal pH for both samples was 4.5, however the crude extract reached a plateau at pH values ranging from 4.5 to 5.0, while the purified β -glucosidase showed a gradual decrease occurred at pH values higher than 4.5 (Fig. 3B), indicating that the enzyme under study is an acidic β -glucosidase.

3.4. Susceptibility towards metal ions, alcohols and chaotropic agents on the β -glucosidase activity

A variety of metal ions and chemical reagents were evaluated for their effects on the pure MTbgl3b. All type of ions, solutions and the relative enzymatic activity response are presented in Figure 4A and 4B. The enzyme was weakly inhibited in the presence of barium and sodium chloride, holding 86.6% and 86.2% of activity, copper sulfate, magnesium chloride, iron and zinc sulfate inhibited the β -glucosidase showing 24.0%, 19.5%, 6.9% and 4.0% of residual activities. In the other hand cobalt, calcium and potassium chloride and manganese sulfate showed residual activities bigger than 94%.

In the presence of SDS, EDTA and sodium azide the enzyme had a little inhibition effect followed by mercaptoethanol (β ME) with 93.4% of residual activity. The surfactants triton X-100 and tween 80, do not influenced the MTbgl3b β -glucosidase activity.

The influence of ethanol and methanol on the hydrolytic activity were also evaluated and both alcohol applied decreased the enzymatic activity even at 5% of alcohol. The results also shown that longer chain length promote either inhibition or inactive conformation of the enzyme since lower recovery in relative active were measured in enzymatic reactions with ethanol (Fig. 4C). β -glucosidase from *Melanocarpus* sp MTCC 3932 and *Thermoascus aurantiacus* had a positive influence in the enzyme activity when methanol and ethanol were added to the reaction; two β -glucosidases (β GII and β GIII) of *Aspergillus terreus* were inhibited in ethanol and methanol 20%, however a third isoform (β GI) was positively influenced in their presence (Kaur et al. 2007, Parry et al. 2001, Nazir et al. 2009). Some works interpreted the increase of activity in the presence of alcohols as a positive influence on the hydrolytic activity, however this behavior can also be explained for the increase on transglycosylation rate, which p-Nitrophenyl glucopyranoside is used as a proton donor and methanol/ethanol as a nucleophilic acceptor increasing the p-Nitrophenol concentration from hydrolytic and transglycosylation mechanisms, since both reactions may occur simultaneously (Bohlin et al. 2013).

3.5. Substrate specificity toward di-, polisaccharides and artificial substrates

The purified MTbgl3b was assayed for its activity under the conditions as described in section 2.4. The preferred substrates for MTbgl3b were cellobiose and p- β -NP-glucopyranoside (p- β -NPG), lower specific activity were observed to laminarin, lichenan, β -glucan and p- β -NP-cellobioside (Fig. 4D). No detectable activity towards 4-

p- β -NP-galactopyranoside, -xyloside, -mannopyranoside, -fucopyranoside, 4-p- α -NP-L-arabinofuranosidase, avicel, carboxymethylcellulose (CMC), sigma cell, pectin, xyloglucan, beech and birch wood xylan, arabinogalactan, galactomannan and lactose was observed. MTbgl3b shown a strong affinity to cellobiose (53.0 U/mg), however it is also able to hydrolyze β -glucans, such as laminarin (12.7 U/mg) and lichenan (5 U/mg), moreover aryl- β -glucoside (40.2 U/mg) was also broken down. Thereby MTbgl3b can not be only classified as cellobiases for it has been active on different types of substrates.

3.6. Kinetics analysis and enzymatic stability of β -glucosidase.

Kinetic study was made using synthetic (p- β -NPG) and natural (cellobiose) substrates at the best conditions previously estimated. To the cellobiose the parameters were measured using the crude extract and MTbgl3b enzyme. To study the inhibition by glucose only p- β -NPG substrate was used. The K_m and V_{max} values were estimated using GraphPad Prism version 5.00, which the β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila* M.7.7 followed simple Michaelis-Menten (MM) kinetics. Lineweaver-Burk and Dixon plots were used to determine whether Michaelis-Menten could be applied. The kinetics parameters values are shown in Table 3.

The K_m results indicated that the pure MTbgl3b and the β -glucosidases in the crude enzymatic extract have greater affinity toward p- β -NPG (0.46mM) and cellobiose (0.52 mM), respectively. On the other hand the maximum specific activity (V_{max}) to the pure MTbgl3b on cellobiose was 2-fold higher than the crude extract on cellobiose and MTbgl3b on p- β -NPG. Thereby, spite of the pure MTbgl3b has showed higher affinity on p- β -NPG, the hydrolysis is more efficient and faster on cellobiose.

The MTbgl3b catalytic efficiency determined on p- β -NPG were compared to β -glucosidases from *Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*, including two recombinant GH3 from *Penicillium brasilianum* and

Myceliophthora thermophila ATCC 42424 (model ID 66804) (Table 3), which GH3 from *T. aurantiacus* was the highest efficient enzyme, however the ratio K_m/K_i calculated to identify the inhibitor influence revealed strongest inhibition by D-glucose, also checked to the recombinant GH3 from *M. thermophila* ATCC 42464 cloned in *Pichia pastoris*. β -glucosidase from *A. niger* usually used as supplemental enzyme to *T. reesie* cocktail shown lower catalytic efficiency than MTbgl3b and also was inhibited by D-glucose. In this study the MTbgl3b was competitively inhibited by D-glucose (K_i of 4.26 mM), confirmed by Lineweaver-Burk plot (Fig. 5A).

The p- β -NPG hydrolysis by MTbgl3b followed the MM kinetics up to 1 mM, being the initial rate 40% reduced at 6 mM of the substrate. Inhibition was not observed on cellobiose hydrolysis up to 6 mM, moreover the maximum initial rate to MTbgl3b was 2-fold higher than the β -glucosidase in the crude extract (Fig. 5B).

To have a full kinetic model for enzymes applied to industrial process, an important parameter is the stability of the enzymatic activity on the temperature, thereby the thermal stability and half-life ($t_{1/2}$) were identified incubating MTbgl3b at 80, 70, 60 and 50°C using two different pHs, 5.0 and 7.4, for irregular time intervals. Overall thermal stability assays at pH 7.4 had reduced half-life when compared to pH 5.0, which at 80, 70 and 60°C showed half-life of 2.32, 28.88 min and 7.22 h, respectively, while 1.41, 1.68 min and 2.96 h at pH 7.4. The highest $t_{1/2}$ was 16 days at pH 5.0 and 50°C, while at pH 7.4 was only 3.85 h. The best conditions reached for the thermal stability (pH 5.0 and 50°C) are in general the operational parameters used in enzymatic biomass saccharification, that is the aim application of this enzyme (Delabona et al. 2013, Sukumaran et al. 2009, Rivera et al. 2010). The activation of denaturation energy (E_{ad}) was also calculated applying Arrhenius equation (Chauve et al. 2010) and the thermal

stability datas from 50 up to 80°C, being 288.35 kJ·mol⁻¹, which is consistent to Doran (2002).

4. Conclusions

The kinetic model profile and susceptibility towards substrates indicated high specificity and catalytic efficiency of MTbgl3b on cellobiose, that did not inhibit MTbgl3b as was observed to p-β-NPG. The enzyme also shown high thermal stability and half-life, optimal temperature and pH activity parameters settled to be applied for enzymatic biomass saccharification process. MTbgl3b is also faster and less inhibited by D-glucose than β-glucosidase from *A. niger* usually used as supplemental cocktail in enzymatic hydrolysis. Furthermore proteomic analysis identified GHs and AAs, indicating hydrolytic and oxidative mechanism disruption. Thereby *Myceliophthora thermophila* M.7.7. seems to be a rich source of thermo stable enzymes to biofuel production.

Figure Captions

Fig.1. 2-DE gel zone defined by pH 3.0-10 from *M. thermophila* secretome growth on wheat bran (A). Specific activities ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) for *M. thermophila* secretome using several substrates (B)

Fig 2. Purification steps of β -glucosidase by non denaturing PAGE silver nitrate staining. 1- Molecular marker, 2- crude extract, 3- anionic exchange, 4- hydrophobic, 5- superdex G-25 and 6-activity test for β -glucosidase activity, details described in the materials and methods section.

Fig.3. Optimal temperature (A) and pH (B) of the crude extract and MTbgl3b from *Myceliophthora thermophila* M.7.7. The optimal temperature was identified by testing a range from 30 up to 80°C in 50 mM citrate buffer pH 5.0 The influence of pH on β -glucosidase activity was determined at 60°C using McIlvaine 100 mM buffer that were within pH 2.0-10.0.

Fig.4. MTbgl3b Residual activities (%) toward metal ions (10 mM) (A), chaotropic agents (5%) (B), alcohols (C) and specific activity using several substrates (D). The activity of the purified enzyme was measure without any additive at 60°C, pH 4.5 and taken as 100%.

Fig.5. Lineweaver-burk plot of MTbgl3b on p- β -NPG for inhibition by D-glucose ranging from 0 to 40 mM (A). Initial rates of p- β -NPG and cellobiose hydrolysis applying the crude extract and MTbgl3b from *Myceliophthora thermophila* M.7.7 (B).

Tables and Figures

Table 1. CAZy and non-CAZy enzymes identified by LC/MS-MS from supernatants of *M. thermophila* grown on wheat bran.

Protein name	gi accession number	Molecular mass (kDa)	pI	Mascot Score	Peptides matched	%Sequence coverage
β -glucosidase (GH3)	367028272	95.0	5.08	795	24	17
GH2	367020936	66.0	5.57	685	18	30
Endo- β -1,4-glucanase (GH5)	367019458	42.4	5.19	98	2	4
Cellobiohydrolase (GH6)	367023495	51.0	5.53	218	5	9
Cellobiohydrolase (GH7)	367023008	55.6	4.82	190	4	7
Cellobiohydrolase (GH7)	367030645	49.0	4.82	363	6	17
Endo- β -1,4(3)-xylanase (GH10)	367029119	41.5	6.43	158	5	16
Endo-xylanase (GH10)	367032838	44.5	5.80	473	8	23
GH10	367030563	35.7	5.88	242	3	15
Endo- β -1,4(3)-xylanase (GH11)	367020944	24.2	5.76	248	4	30
GH11	367028490	25.3	6.18	158	3	12
GH11	367022650	25.0	7.05	116	3	12
Glucoamylase (GH15)	367035092	67.0	5.14	837	13	25
GH16	367033451	30.8	5.12	305	5	18
Chitinase (GH18)	367028520	46.1	5.11	836	15	42
Chitinase (GH18)	367031394	44.6	5.54	1058	24	56
β -N-acetylhexosaminidases (GH20)	367018790	64.7	5.20	686	13	24
GH27	367036174	45.4	4.87	343	7	17
GH30	367025151	53.2	5.75	546	11	25
α -xylosidase (GH31)	367028438	96.9	5.84	961	22	22
Trehalase (GH37)	367018214	77.5	6.17	246	6	9
α -mannosidase (GH38)	367019856	123	6.17	2262	45	43
β -xylosidase (GH43)	367026528	61.4	4.91	212	4	10
α -mannosidase (GH47)	367029671	57.7	4.81	674	15	30
α -L-arabinofuranosidase (GH51)	367019058	71.2	5.88	259	5	8
β -1,3-glucanase (GH55)	367030077	81.7	5.20	628	15	24
GH74	367029777	78.6	4.60	526	10	15
Endo- β -1,3-glucanase (GH81)	367029685	91.0	5.76	1161	22	28
CBM1	367028196	88.3	5.19	1244	29	28
Pectate lyase (PL1)	367029401	33.7	5.70	583	16	28
Pectin lyase (PL1)	367030527	36.7	7.57	230	5	10
Carboxylesterase (CE1)	367034113	29.2	5.93	156	3	17
Acetylesterase (CE16)	367031128	32.4	4.41	153	3	12
CDH (AA3_1)	367030519	84.0	4.58	282	5	8
GMC oxidoreductase (AA3)	367023276	69.0	4.88	891	22	29
Glyoxal oxidase (AA5_1)	367018916	104	4.68	381	8	9
Laccase-multicopper oxidase (AA1_3)	367021116	65.8	5.25	225	5	9
Lytic polysaccharide oxidase (AA9)	367020938	31.5	6.16	128	2	7
Serine protease	367026259	40.0	6.31	239	5	15
Catalase	367027496	78.1	6.04	1240	31	34
Aldose epimerase	367031144	41.4	4.82	177	4	12
Peptidase	367036144	53.6	5.66	495	13	17
Fasciclin domain protein	367021438	56.7	5.81	237	5	11
Carboxypeptidase	367025121	45.8	6.15	288	5	17
MYCTH_2295992	367019898	98.1	5.36	119	3	5
MYCTH_2311272	367034482	17.1	6.05	132	2	15
MYCTH_2294250	367018350	79.5	5.47	489	10	12
MYCTH_2311687	367034906	25.5	5.46	114	2	9
MYCTH_80274	367028324	89.3	5.32	154	3	5
MYCTH_2304549	367027626	66.0	5.45	187	3	6
MYCTH_2308135	367031276	104	5.80	240	3	16
MYCTH_2299483	367022986	68.8	4.88	312	6	10
MYCTH_2305043	367028022	86.7	6.27	149	3	5
MYCTH_2303093	367026354	61.5	4.89	120	2	5
MYCTH_2298860	367022378	42.6	4.72	106	2	4
MYCTH_2307666	367030735	55.2	4.78	155	7	7
MYCTH_2126295	367026512	52.3	5.33	330	10	14
MYCTH_2307339	367030383	75.5	4.67	497	9	16
MYCTH_2307269	367030313	39.8	5.50	824	14	54

Table 2. Summary of purification of B-glucosidase from *M. thermophila* M.7.7.

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor (fold)	%Yield
Crude filtrate	83,60	1000,00	11,96	1,00	100,00
Concentration	5,16	188,80	36,59	3,06	18,88
Resorce Q	4,24	253,70	59,83	5,00	25,37
HIC	0,22	27,59	125,96	10,53	2,76
G-75	0,18	18,88	104,89	8,77	1,89

Table 3. Kinetic parameters of β -glucosidase from *M. thermophila* M.7.7 and efficiency and inhibition comparison with other β -glucosidases from fungae.

Substrate Parameter	p- β -NPG	Cellobiose	
		Pure β -glucosidase	Crude extract
$V_{\max}$ ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	60.85 ± 0.05	120.33 ± 0.09	54.37 ± 0.05
K_m (mM)	0.46 ± 0.07	0.86 ± 0.10	0.52 ± 0.08
K_i (mM)	4.26 ± 0.71	-	-
K_{cat} (s^{-1})	96.34	190.53	86.08
K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	209.12	222.22	165.10

Organism	p- β -NPG		Reference
	K_{cat}/K_m (*)	K_m/K_i	
<i>Myceliophthora thermophila</i>	13292	0.11	This study
<i>Trichoderma reesei</i>	13884	0.12	Chauve, et al.
<i>Aspergillus niger</i>	2775	0.21	Chauve, et al.
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	127810	0.40	Parry, et al.
<i>Penicillium brasilianum</i> ^(a)	-	0.04	Kristian, et al.
<i>Myceliophthora thermophila</i> ATCC 42424 ^(b)	-	1.34	Karnaouri, et al.

* K_{cat}/K_m unit, $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ^(a) GH3 from *Penicillium brasilianum* expressed in *Aspegillus oryzae*^(b) GH3 from *M. thermophila* ATCC 42424 expressed in *Pichia pastoris*

Figure 1A and 1B

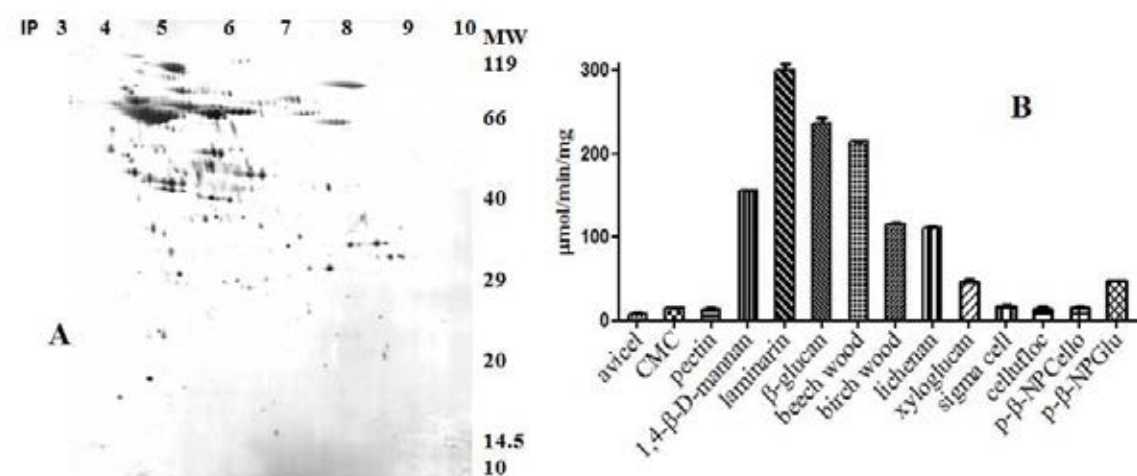


Figure 2

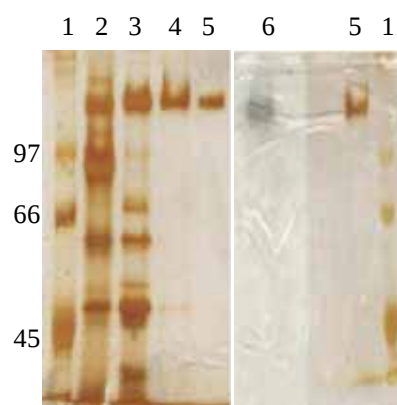


Figure 3A and 3B

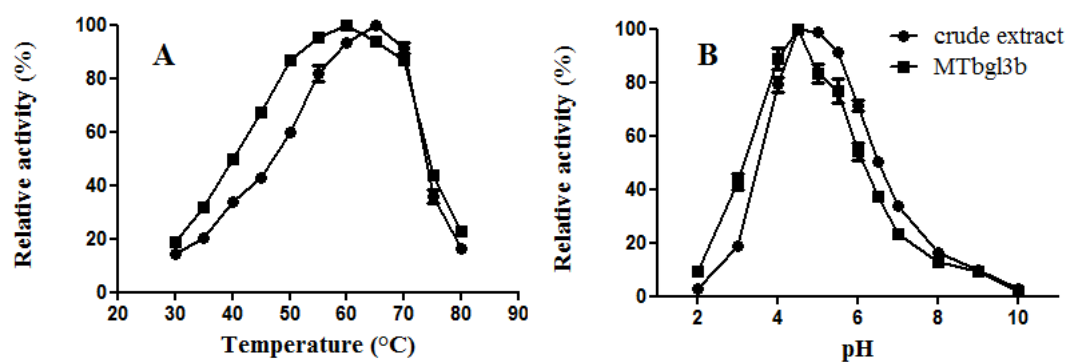


Figure 4

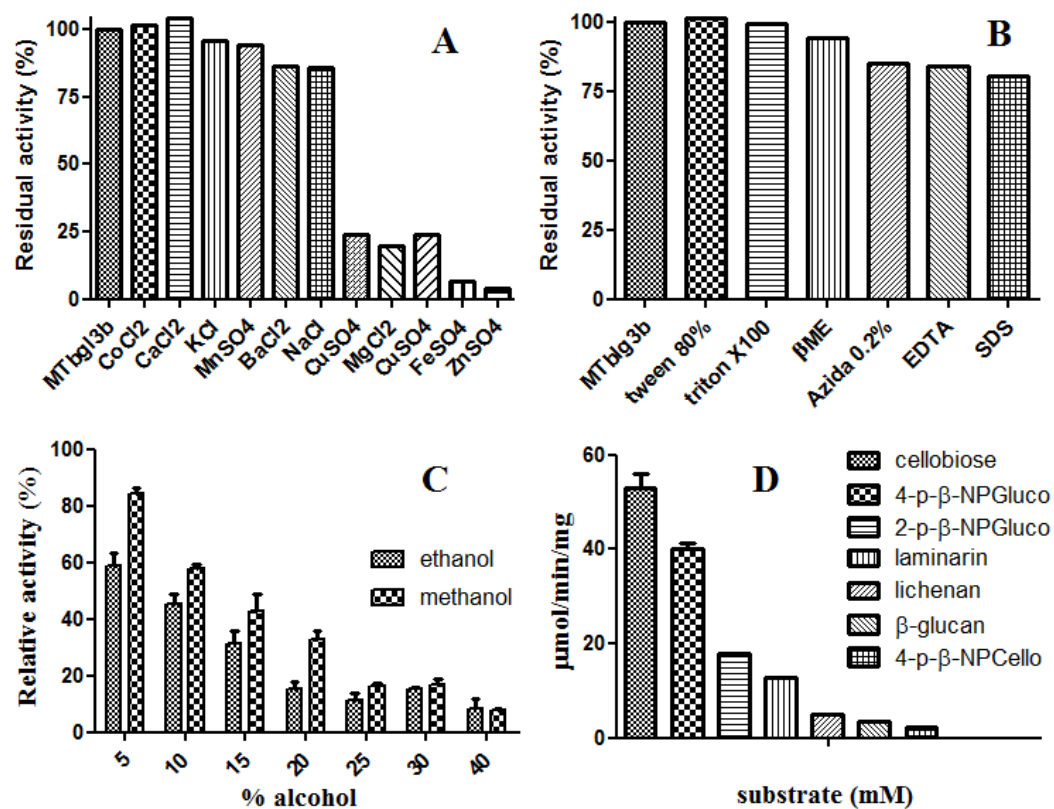
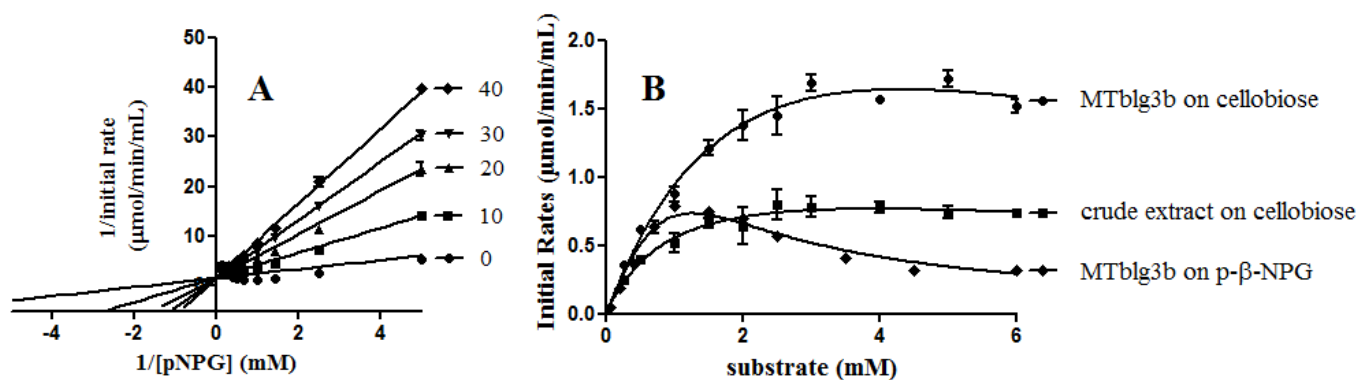


Figure 5



References

- Aguiar-Oliveira, E., and F. Maugeri. 2011. "Thermal Stability of the Immobilized Fructosyltransferase from *Rhodotorula* Sp." *Brazilian Journal of Chemical Engineering* no. 28 (3):363-372.
- Bohlin, Christina, Eigil Praestgaard, MartinJ Baumann, Kim Borch, Jens Praestgaard, RuneN Monrad, and Peter Westh. 2013. "A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal β -glucosidases." *Applied Microbiology and Biotechnology* no. 97 (1):159-169. doi: 10.1007/s00253-012-3875-9.
- Chauve, M., H. Mathis, D. Huc, D. Casanave, F. Monot, and N. Lopes Ferreira. 2010. "Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases." *Biotechnol Biofuels* no. 3 (1):3. doi: 10.1186/1754-6834-3-3.
- Dekker, R. F. 1986. "Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial beta-D-glucosidase (cellobiase) preparation from *aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose." *Biotechnol Bioeng* no. 28 (9):1438-42. doi: 10.1002/bit.260280918.
- Delabona, Priscila da Silva, Júnio Cota, Zaira Bruna Hoffmam, Douglas Antonio Alvaredo Paixão, Cristiane Sanchez Farinas, João Paulo Lourenço Franco Cairo, Deise Juliana Lima, Fábio Marcio Squina, Roberto Ruller, and José Geraldo da Cruz Pradella. 2013. "Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -l-arabinofuranosidase." *Bioresource Technology* no. 131 (0):500-507. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.105>.
- Doran, P. M.; *Bioprocess Engineering Principles*; Academic Press; New York; 439 pp.; 2002
- Gallifuoco, A., L. D'Ercole, F. Alfani, M. Cantarella, G. Spagna, and P. G. Pifferi. 1998. "On the use of chitosan-immobilized beta-glucosidase in wine-making: kinetics and enzyme inhibition." *Process Biochemistry* no. 33 (2):163-168.
- Himmel, M. E., and E. A. Bayer. 2009. "Lignocellulose conversion to biofuels: current challenges, global perspectives." *Curr Opin Biotechnol* no. 20 (3):316-7. doi: S0958-1669(09)00064-0 [pii] 10.1016/j.copbio.2009.05.005.
- Kaur, J., B. S. Chadha, B. A. Kumar, G. S. Kaur, and H. S. Saini. 2007. "Purification and characterization of beta-glucosidase from *Melanocarpus* sp MTCC 3922." *Electronic Journal of Biotechnology* no. 10 (2):260-270.
- Krogh, Kbrm, P. V. Harris, C. L. Olsen, K. S. Johansen, J. Hojer-Pedersen, J. Borjesson, and L. Olsson. 2010. "Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 beta-glucosidase from *Penicillium brasilianum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* no. 86 (1):143-154. doi: 10.1007/s00253-009-2181-7.
- Kumar, R., S. Singh, and O. V. Singh. 2008a. "Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives." *J Ind Microbiol Biotechnol* no. 35 (5):377-91. doi: 10.1007/s10295-008-0327-8.
- Kumar, Raj, Sompal Singh, and OmV Singh. 2008b. "Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* no. 35 (5):377-391. doi: 10.1007/s10295-008-0327-8.
- Lymar, E. S., B. Li, and V. Renganathan. 1995. "Purification and Characterization of a Cellulose-Binding (beta)-Glucosidase from Cellulose-Degrading Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*." *Applied and Environmental Microbiology* no. 61 (8):2976-2980.
- Magalhães, P. O., A. Ferraz, and A. F. M. Milagres. 2006. "Enzymatic properties of two β -glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping conditions."

- Journal of Applied Microbiology* no. 101 (2):480-486. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02946.x.
- Mandels, Mary, and James Weber. 1969. "The Production of Cellulases." In *Cellulases and Their Applications*, 391-414. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.
- Miller, G. L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* no. 31 (3):426-428. doi: 10.1021/ac60147a030.
- Moretti, M. M., D. A. Bocchini-Martins, R. D. Silva, A. Rodrigues, L. D. Sette, and E. Gomes. 2012. "Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation." *Braz J Microbiol* no. 43 (3):1062-71. doi: 10.1590/S1517-838220120003000032.
- Nazir, A., S. Soni, H.S. Saini, R.K. Manhas, and B.S. Chadha. 2009. "Regulation of expression of multiple betaglucosidase of *Aspegillus Terreus* and their purification and characterization." *BioResources* no. 4 (1):155-171.
- Pallapolu, Venkata Ramesh, Y. Y. Lee, Rebecca J. Garlock, Venkatesh Balan, Bruce E. Dale, Youngmi Kim, Nathan S. Mosier, Michael R. Ladisch, Matthew Falls, Mark T. Holtzapple, Rocio Sierra-Ramirez, Jian Shi, Mirvat A. Ebrik, Tim Redmond, Bin Yang, Charles E. Wyman, Bryon S. Donohoe, Todd B. Vinzant, Richard T. Elander, Bonnie Hames, Steve Thomas, and Ryan E. Warner. 2011. "Effects of enzyme loading and β -glucosidase supplementation on enzymatic hydrolysis of switchgrass processed by leading pretreatment technologies." *Bioresource technology* no. 102 (24):11115-11120.
- Park, A. R., J. H. Hong, J. J. Kim, and J. J. Yoon. 2012. "Biochemical Characterization of an Extracellular β -Glucosidase from the Fungus, *Penicillium italicum*, Isolated from Rotten Citrus Peel." *Mycobiology* no. 40 (3):173-80. doi: 10.5941/MYCO.2012.40.3.173.
- Parry, N. J., D. E. Beever, E. Owen, I. Vandenberghe, J. Van Beeumen, and M. K. Bhat. 2001. "Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*." *Biochemical Journal* no. 353:117-127.
- Phillips, C. M., W. T. Beeson, J. H. Cate, and M. A. Marletta. 2011. "Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*." *ACS Chem Biol* no. 6 (12):1399-406. doi: 10.1021/cb200351y.
- Regalbuto, J. R. 2009. "Engineering. cellulosic biofuels--got gasoline?" *Science* no. 325 (5942):822-4. doi: 10.1126/science.1174581.
- Regalbuto, J. R. 2011. "The sea change in US biofuels' funding: from cellulosic ethanol to green gasoline." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* no. 5 (5):495-504. doi: 10.1002/bbb.298.
- Rivera, Elmer Ccopa, Sarita Cândida Rabelo, Daniella dos Reis Garcia, Rubens Maciel Filho, and Aline Carvalho da Costa. 2010. "Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* no. 85 (7):983-992. doi: 10.1002/jctb.2391.
- Singhania, R. R., A. K. Patel, R. K. Sukumaran, C. Larroche, and A. Pandey. 2013. "Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production." *Bioresour Technol* no. 127:500-7. doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.012.
- Sukumaran, Rajeev K., Reeta Rani Singhania, Gincy Marina Mathew, and Ashok Pandey. 2009. "Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production." *Renewable Energy* no. 34 (2):421-424. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2008.05.008>.

Weber, Klaus, and Mary Osborn. 1969. "The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Journal of Biological Chemistry* no. 244 (16):4406-4412.